

**ROBSON RUIZ OLIVOTO**

**EFEITOS DO EUGENOL, SOBRE O PROCESSO DE ACOPLAMENTO  
EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO (AEC) DE MÚSCULO CARDÍACO DE  
RATO: ENVOLVIMENTO DA VIA RECEPTOR  $IP_3$  ( $IP_3R$ )**

**CURITIBA  
2008**

**ROBSON RUIZ OLIVOTO**

**EFEITOS DO EUGENOL, SOBRE O PROCESSO DE ACOPLAMENTO  
EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO (AEC) DE MÚSCULO CARDÍACO DE  
RATO: ENVOLVIMENTO DA VIA RECEPTOR  $IP_3$  ( $IP_3R$ )**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular – Área Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estevam Nolf Damiani


**CURITIBA  
2008**

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

## PARECER

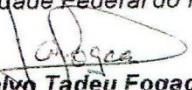
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Dr. Carlos Estevan Noll Damiani**

Orientador e presidente da Banca (Universidade Federal do Paraná - UFPR)

  
**Dra. Ana Lúcia Tararathuch**

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

  
**Dr. Rosalvo Tadeu Fogaça**

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

Como Suplente:

**Drª. Ilana Kassouf Silva**

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

após argüir o(a) mestrando(a) **Robson Ruiz Olivoto** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "Efeitos do eugenol, sobre o processo de acoplamento excitação-contração (AEC) de músculo cardíaco de rato: envolvimento da via receptor  $IP_3$  ( $IP_3R$ )", é de parecer favorável à **Aprovação** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 12 de dezembro de 2008

  
**Silvio Sanches Veiga**  
Coordenador do Curso

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, prof. Dr. Carlos Estavam Nolf Daminani, por toda dedicação, compreensão e confiança dedicadas a mim.

Aos professores Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilana Kassouf Silva pela imprescindível colaboração durante a realização desta pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica Gileade e Melane pela colaboração em meus experimentos.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular que durante suas aulas ou em conversas informais colaboraram significativamente com o desenrolar de meus experimentos.

Aos funcionários do Biotério da Universidade federal do Paraná, setor de Biológicas.



## SUMARIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1 – Estruturas Celulares Envolvidas no Processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC) do Músculo Cardíaco.....	16
1.1- Membrana Plasmática (Sarcolema) e Glicocálice.....	17
1.2- Túbulos-T .....	21
1.3- Retículo Sarcoplasmático (RS) .....	21
1.4- Sarcômero e Miofilamentos .....	23
2 – Regulação da Atividade das Proteínas Contráteis.....	27
3 – Biologia Molecular dos Canais de Cálcio dos Miócitos Cardíacos.....	31
3.1- Proteínas que Regulam o Influxo Celular de Cálcio.....	31
I) Canais de cálcio da membrana plasmática .....	31
a) Receptores Diidropiridínicos (DHPRs) .....	34
II- Canais de cálcio da membrana do retículo sarcoplasmático.....	35
a) Receptores de Rianodina (RyRs).....	35
b) Receptores IP <sub>3</sub> (IP <sub>3</sub> Rs).....	38
3.2 – Proteínas que Removem o Cálcio do Citosol.....	43
4 – Processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC) .....	43
4.1– Acoplamento excitação-contração e a Via Receptores Inositol 1,4,5-trifosfato (IP <sub>3</sub> Rs).....	51
5 – Óleos Essenciais – Eugenol .....	54
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>
OBJETIVO GERAL.....	56
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
1– Animais .....	57
2– Protocolos Experimentais .....	57
2.1– Experimentos com Estimulação Elétrica Indireta .....	57
2.1.1– Efeitos do eugenol sobre a força da contração isométrica do músculo atrial: Curva Dose-Resposta .....	58
2.1.2– Efeitos do eugenol sobre a mobilização do cálcio intracelular e extracelular.....	58

2.1.3– Efeitos do eugenol sobre os receptores $IP_3$ .....	59
2.1.4– Efeito Tempo-Dependente do 2-APB .....	59
2.1.5- Efeitos do eugenol sobre receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos: A via dos $IP_3$ Rs..	59
2.1.6 – Efeitos do eug sobre os receptores de rianodina e os receptores $IP_3$ ....	60
2.2– Experimentos Com Fibras Atriais Permeabilizadas ( <i>Skinned Fiber</i> ).....	60
2.2.1 – Experimentos com trabéculas de músculo atrial desmembranadas através do uso de Saponina e/ou Triton X-100 .....	61
a) Metodologia para as preparações .....	61
b) Soluções.....	61
c) Medidas de força .....	63
2.2.2– Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC em fibras atriais permeabilizadas por saponina .....	64
2.2.3 – Efeitos do 2-APB sobre a ação do eugenol no processo de AEC em fibras permeabilizadas por saponina.....	65
2.2.4 – Efeitos da Heparina sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina.....	65
2.2.5 – Efeitos do Ruthenium Red (RR) sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina .....	65
2.2.6 – Efeitos da Heparina e da Procaína sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina .....	66
2.2.7 – Efeitos do BDM sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina .....	66
2.3 – Átrios permeabilizados por Triton X-100.....	67
2.3.1 – Efeitos do eugenol no processo de AEC em fibras atriais permeabilizadas por Triton X-100 (1% - vol/vol) .....	67
2.3.2 – Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC antes e depois das fibras atriais serem permeabilizadas com Triton X-100 .....	68
3 – Drogas .....	69
4 – Análise Estatística .....	69
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
1 – Experimentos com Estimulação Elétrica Indireta: Músculo Intacto .....	70
1.1- Efeitos do eugenol sobre o processo AEC: Curva Dose-Resposta.....	70
1.2 - Efeitos do eug sobre a mobilização do cálcio intracelular e extracelular. ...	72

1.3 - Efeitos do eugenol sobre receptores $IP_3$ .....	74
1.4 - Efeito Tempo-Dependente do 2-APB.....	76
1.5- Efeitos do eugenol sobre os receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos: A via $IP_3R$ .....	78
1.6 – Efeitos do eugenol sobre os receptores de rianodina e os receptores $IP_3$ .....	81
2 – Experimentos com Fibras Permeabilizadas: Trabéculas Atriais .....	83
2.1– Experimentos com Fibras Atriais Permeabilizadas por Saponina ( <i>Skinned Fibers</i> ).....	83
2.1.1– Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC em fibras permeabilizadas por saponina.....	83
2.1.2– Efeitos eugenol sobre o AEC e a via $IP_3Rs$ .....	85
2.1.3 – Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina e tratadas com BDM .....	93
2.2 – Experimentos com Fibras Atriais Permeabilizadas por Triton X-100 1% ( <i>Skinned Fiber</i> ).....	95
2.2.1 – Efeito do eugenol em fibras atriais permeabilizadas por Triton X-100 (1% - vol/vol).....	95
2.2.2– Efeitos do eugenol antes e depois da permeabilização com Triton X-100 (1% - vol/vol).....	97
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- O Músculo Cardíaco.** À esquerda observamos o aspecto externo do coração com seus principais componentes. Os ventrículos ocupam a maior parte do coração. Todas as artérias e vasos ligam-se à base do coração. À direita podemos observar uma fotomicrografia de um miócito cardíaco ventricular isolado pela técnica de separação por enzimas. Adaptado de Silverthorn,D.U., 2003..... **19**
- Figura 2- A Membrana Celular.** A membrana celular é uma camada dupla de moléculas de fosfolipídios. Proteínas de vários tipos estão inseridas e atravessando completamente a bicamada fosfolipídica, e os carboidratos ligam-se a proteínas e lipídios na superfície externa – Glicocálice. Adaptado de Silverthorn, D.U., 2003..... **20**
- Figura 3- Túbulos-T e o Retículo Sarcoplasmático.** O retículo sarcoplasmático engloba cada miofibrila. O sistema de túbulos-T está intimamente associado com o retículo sarcoplasmático. Adaptado de Silverthorn, D.U.,2003..... **22**
- Figura 4- Miofilamentos: Miosina.** A molécula de miosina tem aproximadamente 170 nm de comprimento e apresenta duas cabeças globulares (S1) e caudas (incluindo a meromiosina leve LMM + S2), as quais se apresentam como uma cauda entrelaçada. As duas cadeias leves (MLC) estão indicadas na região do pescoço. (Adaptado de Warshaw, 1996)..... **24**
- Figura 5- Miofilamentos: Actina.** Desenho representativo do complexo estrutural da actina. (Adaptado de Solaro & Rarick, 1998)..... **26**
- Figura 6 – A Condição de Repouso.** Na condição de repouso, o terminal C da TnI está ligado à actina, desta forma, ancorando o complexo TnT-tropomiosina (Tm) e, impedindo que a cabeça da miosina (S1) se ligue à actina (Adaptado de Solaro & Rarick, 1998)..... **29**

- Figura 7 – Os Miofilamentos em Presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga ao terminal amino da TnC, esta região se liga fortemente ao terminal carboxil da TnI, a qual se desloca da actina permitindo que o complexo TnT-Tm se desloque para o fundo da fenda formada pela actina e, conseqüentemente, exponha os sítios situados ao longo da actina aos quais irão interagir as cabeças S1 da miosina. (Adaptado de Solaro & Rarick, 1998)..... **30**
- Figura 8 – O Canal de Cálcio.** Desenho representativo de um canal lento de cálcio mostrando suas respectivas subunidades circundando o poro central (Adaptado de Perez – Reyez & Schneider, 1995)..... **32**
- Figura 9 - Estrutura Organizacional dos Canais Lentos de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Subunidade  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  e  $\delta$ . Subunidade  $\alpha 1$  formada pro quatro *Motifs* e cada um deles composto por seis segmentos transmembrana. Subunidade  $\alpha 2$  com disposição não citosólica e ligada à subunidade  $\delta$  por pontes dissulfeto. Subunidade  $\delta$  com um único segmento transmembrana. Subunidade  $\beta$  com disposição citosólica, ligada por um domínio de interação peptídica citosólico a subunidade  $\alpha 1$  entre os *Motifs* I e II (Adaptado de Bodi et al., 2005)..... **33**
- Figura 10 – Arranjo entre os DHPRs e RyRs.** Desenho esquemático identificando o túbulo transversal com os canais Diidropiridínicos (DHPRs) em sobreposição aos canais Rianodínicos (RyRs2) de músculo cardíaco. É possível também identificar o fluxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelos DHPRs em direção aos RyRs2 (Adaptado de Fill e Copello, 2002)..... **37**
- Figura 11 – Estrutura Molecular dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$ .** Desenho esquemático de um  $\text{IP}_3\text{R}$ . Identificando os segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélice 5 e 6 responsáveis pela formação do poro permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Observamos também, os sítios de ligação na região amino

- terminal, do  $\text{InsP}_3$ . (Adaptado de Foskett et al., 2007)..... 42
- Figura 12 – Calcium Induced Calcium Release (CICR).** Desenho esquemático representando o processo de AEC por CICR. Canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  permitem o influxo deste íon durante a despolarização da membrana aumentando sua concentração citosólica, que por sua vez, altera a atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . O cálcio citosólico ao ligar-se aos RyRs induz a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no RS (Adaptado de Bers, 2002).... 46
- Figura 13 - Maquinaria de Sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  nos Miócitos Atriais.** A figura mostra nos miócitos atriais, o arranjo específico dos componentes envolvidos na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  que contribuem para a geração e modulação dos sinais do  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito atrial. A banda verde do desenho delimita a zona na qual que o sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  deve cruzar no sentido de recrutar os RyRs centrais e disparar a contração. (de: Mackenzie et al., Journal of Cell Science, 117, 6327-6337, 2004)..... 50
- Figura 14 – AEC Via Estimulação  $\alpha$ -Adrenérgica.** Desenho esquemático do processo de AEC via  $\alpha$ -adrenérgico identificando a sequência de eventos iniciados pela ligação entre o agonista e o receptor. Tal ligação induz a ativação da proteína Gs e a conseqüente cascata de eventos mediado pela enzima  $\text{PLC}\beta 1$ . Na seqüência, ocorre a ativação dos canais de cálcio da membrana e do RS resultando, finalmente, na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol (Adaptado de Bers, 2002)..... 53
- Figura 15 - Estrutura Química da Molécula de Eugenol**..... 55
- Figura 16-** Efeitos do eugenol sobre a contração e da tensão de repouso, em condições isométricas, de músculos atriais de ratos: **(A)** Registro típico de experimento mostrando os efeitos do eugenol em diferentes concentrações (1; 3; 5; 7 and 10 mM). **(B)** Curva Dose-Resposta ao eugenol (1 – 10 mM) sobre a tensão de

repouso de músculo atrial de rato. O destaque mostra o “best fit” da curva..... 71

**Figura 17** – Efeitos do eugenol (5 mM) na ausência e na presença de procaína (10 mM) sobre a tensão de repouso desenvolvida pelos músculos atriais de ratos em preparações mantidas em Solução de Ringer Normal **(A)** e Solução de Ringer Zero-cálcio **(B)**. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM; Teste t de Student; #  $p < 0,01$ ; N = 8..... 73

**Figura 18**- Curva dose-resposta dos efeitos do eugenol (1 – 10 mM) sobre a tensão de repouso do músculo atrial na ausência e na presença de 2-APB (100  $\mu$ M). Cada ponto do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de 7 experimentos. #  $p < 0,01$  e \*  $p < 0.05$ ; ANOVA (*one way*) seguida pelo teste de Tukey; 2-APB + Eugenol vs Controle..... 75

**Figura 19** – Ao final do experimento com tratamento com 2-APB (100  $\mu$ M) e eugenol (5 mM), os músculos atriais eram lavados por 3 vezes com solução Ringer Normal e, após 40 minutos a recuperação da força da contração isométrica era reavaliada. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; #  $p < 0,01$ ; Teste t de Student; N = 7; Recuperação vs Controle..... 77

**Figura 20**- Efeitos do eugenol (5 mM) na presença de fenilefrina (PHE) (10  $\mu$ M) sobre a tensão de repouso do músculo atrial. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 experimentos..... 79

**Figura 21**- **(A)** Registro típico e **(B)** representação gráfica mostrando os efeitos da PHE (10  $\mu$ M), 2-APB (100  $\mu$ M) e Eugenol (5 mM) sobre a contração isométrica e/ou tensão de repouso desenvolvida pelo músculo atrial. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 9 experimentos. #  $p < 0.01$ ; Teste t de Student; PHE + 2-APB + Eug vs PHE + 2-APB and PHE + 2-APB + Eug vs Eug (Controle)..... 80

**Figura 22** – Efeitos do eugenol (5 mM) sobre a tensão de repouso isométrica desenvolvida pelo músculo atrial na presença de rianodina (100  $\mu$ M) e na presença de rianodina (100  $\mu$ M) mais 2-APB (100  $\mu$ M). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 7 experimentos. \*  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.01$ ; Teste t de Student; Rianodina + Eug vs Rianodina; and Rianodina + 2-APB + Eug vs Eug (Controle)..... **82**

**Figura 23** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ANOVA, seguida pelo teste de Tukey; N = 7; Eugenol vs Cafeína..... **84**

**Figura 24** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; Eugenol (Controle) vs Cafeína; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ANOVA e seguida pelo teste de Tukey; N = 7..... **86**

**Figura 25** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 7; Eugenol + Heparina vs Eugenol (Controle); Eugenol + Heparina vs Cafeína; Cafeína vs Eugenol (Controle)..... **88**

**Figura 26** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*



p<0,05; Teste t de Student; N= 7. Eugenol + Ruthenium red vs Cafeína; Eugenol (corrigido) vs Cafeína; Eugenol (Controle) vs Cafeína..... 90

**Figura 27** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; # p<0,01; \* p<0,05; Teste t de Student; N= 7. Eugenol + Heparina + Procaína vs Cafeína; Eugenol + Heparina + Procaína vs Eugenol (Controle)..... 92

**Figura 28** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; # p<0,01; \* p<0,05; Teste t de Student; N= 6; Eugenol + BDM 10 mM vs Eugenol (Controle); Eugenol + BDM 30 mM vs Eugenol (Controle). 94

**Figura 29** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. As preparações foram submetidas à solução R relaxante por alguns minutos, em seguida transferida para solução A para obtenção da força máxima; logo depois transferidas, por alguns minutos, novamente para solução R relaxante para quelar o cálcio livre; transferida para a solução L para carregar o RS de cálcio; em seguida transferida para solução E acrescida de Cafeína (30mM); novamente transferida para solução R relaxante para quelar o cálcio livre; novamente transferida para solução L para carregar o RS; e finalmente transferida para solução E acrescida de eugenol; após a contração induzida por eugenol, a trabécula foi transferida para outra solução E com eugenol e Triton X-100 (1%). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; # p<0,01; \*

$p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 7; Eugenol + Triton X-100 vs Eugenol; Eugenol + Triton X-100 vs Cafeína..... 96

**Figura 30** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos e Triton X-100 (1% - vol/vol). As preparações foram submetidas à solução R relaxante por alguns minutos, em seguida transferida para solução A para obtenção da força máxima; logo depois transferidas, por alguns minutos, novamente para solução R relaxante para quelar o cálcio livre; em seguida transferida para solução R acrescida de Cafeína (30 mM); novamente transferida para solução R relaxante para quelar o cálcio livre; transferida para solução R acrescida de eugenol; após a contração induzida por eugenol, a trabécula foi transferida para outra solução R com Triton X-100 (1%) e incubada neste ambiente por 10 minutos para ação permeabilizante do Triton X-100; transferidas após novamente para solução R acrescida de Cafeína (30 mM); lavagem em solução R; transferida para solução R acrescida de Eugenol (5 mM); lavagem em solução R; transferida para solução A. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 8; Eugenol vs pCa4.0; Eugenol vs pCa 4,0 depois de Triton X-100..... 98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Composição das soluções usadas nos experimentos com fibras permeabilizadas por Saponina e por Triton X-100.....	<b>63</b>
<b>Tabela 2-</b> Efeitos do eugenol em diferentes concentrações, na presença e na ausência de 2-APB (100 µM) sobre a tensão de repouso de músculo atrial de ratos. Os resultados são apresentados como média ± EPM; * p<0,05; # p<0,01; Teste t de Student.....	<b>74</b>
<b>Tabela 3-</b> Efeitos do eugenol (5 mM) sobre a tensão de repouso isométrica desenvolvida pelo músculo atrial na presença de rianodina (100 µM) e na presença de rianodina (100 µM) mais 2-APB (100 µM). Os resultados são apresentados como média ± EPM. Teste t de Student; * p<0,05; # p<0,01.....	<b>81</b>
<b>Tabela 4-</b> Efeitos do eugenol (5 mM) sobre a força de contração desenvolvidas por trabéculas atriais permeabilizadas por saponina, na presença e na ausência de 2-APB.....	<b>85</b>
<b>Tabela 5 –</b> Efeitos do Eugenol (5 mM), sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos na presença e na ausência de Heparina (5 mg/ml).....	<b>87</b>
<b>Tabela 6 –</b> Efeitos do <i>Eugenol</i> , sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos na presença e na ausência de Ruthenium Red.....	<b>89</b>
<b>Tabela 7 –</b> Efeitos do Eugenol, sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos na presença e na ausência de Heparina e Procaína.....	<b>91</b>
<b>Tabela 8 –</b> Efeitos do <i>Eugenol</i> , sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos na presença e na ausência de Triton X-100.....	<b>95</b>
<b>Tabela 9 –</b> Efeitos do <i>Eugenol</i> , sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos antes e após a permeabilização com Triton X-100.....	<b>97</b>

## INTRODUÇÃO

A propriedade de produzir movimento é uma das mais surpreendentes da matéria viva e não se constitui em uma propriedade exclusiva do músculo. Existe uma grande variedade de células capazes de produzi-lo. Por exemplo, os movimentos dos leucócitos; os movimentos dos cílios na superfície de algumas células, etc. Em todos estes casos, contudo, esta produção de movimento é secundária e está subordinada a outra função celular. Entretanto, no músculo constitui a função principal, juntamente com a de gerar força. Assim, a função do tecido muscular é a de produzir movimento e/ou gerar força (Cingolani et al., 2004).

Em conformidade com sua estrutura, propriedades contráteis e função, distinguem-se três tipos de músculo: o músculo esquelético, o músculo liso e o músculo cardíaco.

### **1 – Estruturas Celulares Envolvidas no Processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC) do Músculo Cardíaco**

A maior parte do coração é formada por células musculares contráteis, também conhecidas como *miócitos* ou, mais especificamente, *cardiomiócitos*. O restante se constitui de células marcapasso e tecido de condução (os quais estão relacionados com a geração e propagação da atividade elétrica do coração), vasos sangüíneos e espaço extracelular (Brilla et al., 1991). Apesar de existirem diferentes tipos de células no coração, são os miócitos atriais e ventriculares que através de sua contração completam o enchimento cardíaco com sangue e o propõem através da circulação. Os miócitos ventriculares são maiores, apresentando aproximadamente de 10 a 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro e cerca de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de comprimento. Já os miócitos atriais são menores e apresentam aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e cerca de 20  $\mu\text{m}$  de comprimento (Gordon et al., 1966).

Os miócitos cardíacos variam de forma, desde uma simples elipse até um cilindro com ramificações varias vezes mais compridas do que largas. Os miócitos adjacentes estão conectados por estruturas denominadas discos intercalares. Um segmento destes discos - a junção comunicante ou aberta (*gap junction*) - constitui uma união de baixa resistência elétrica, o que permite uma rápida transmissão dos impulsos de célula a célula e implica uma contração praticamente simultânea de todas as fibras. Isso faz com que o tecido cardíaco, sem constituir um sincício

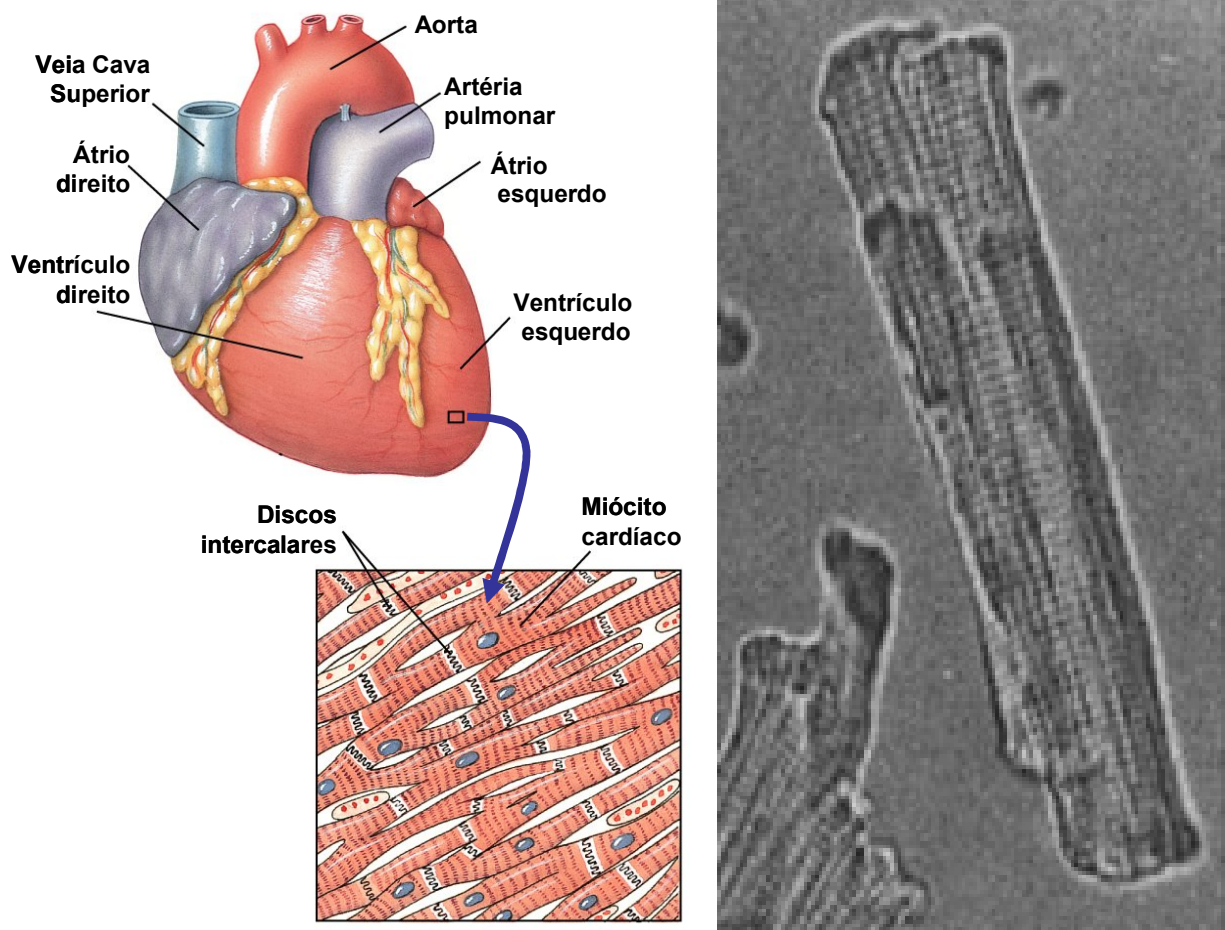
anatômico, comporte-se como tal, do ponto de vista funcional, sendo assim denominado de *sincício funcional* (Gordon et al., 1966) (**Figura 1**).

### **Membrana Plasmática (Sarcolema) e Glicocálice**

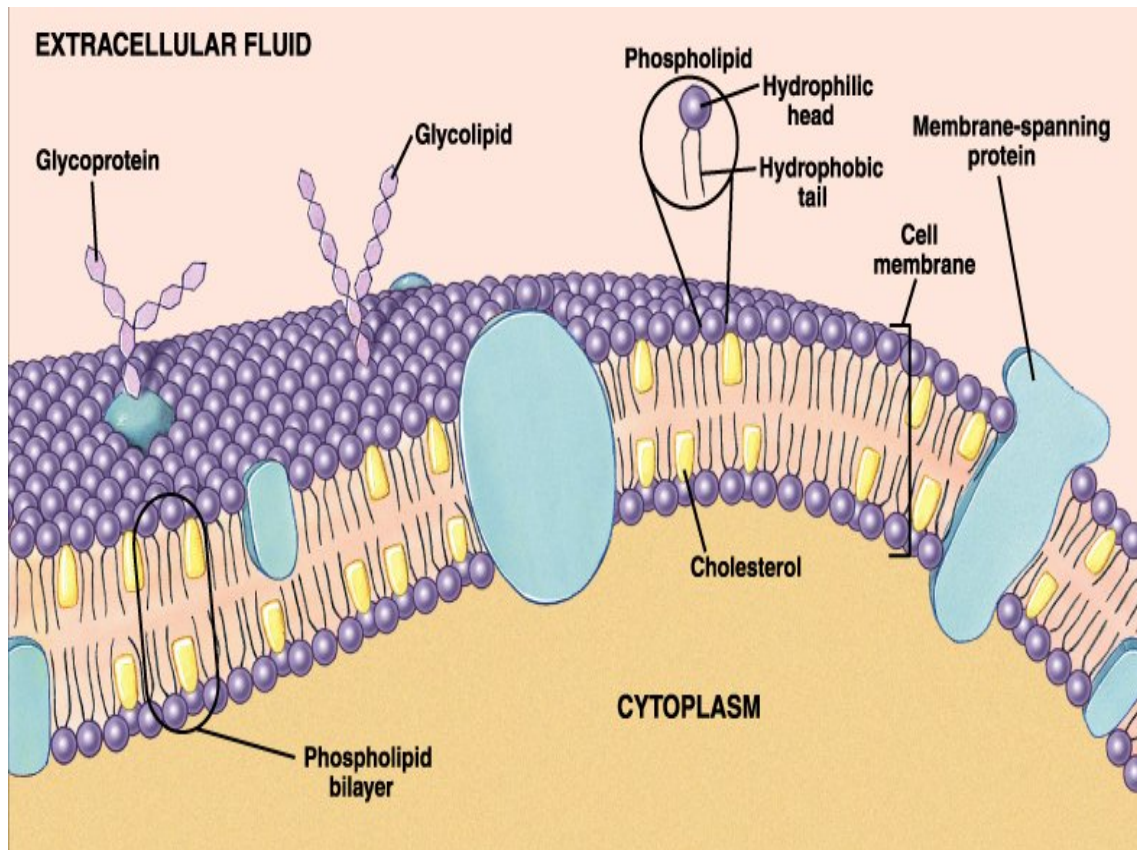
No início da década de 1970, fotografias de microscópio eletrônico obtidas por crio-fratura revelaram o verdadeiro arranjo tridimensional dos lipídios e proteínas dentro das membranas celulares. Em consequência dessa observação, foi proposto o modelo do mosaico fluido da membrana (Singer & Nicolson, 1972). A membrana superficial do miócito cardíaco caracterizada então como uma bicamada lipídica, é de natureza lipoprotéica. A fração lipídica da bicamada é formada por moléculas fosfolipídicas contendo 2 cadeias de ácidos graxos, na parte central, ligadas a porções globulares fosfatadas nas regiões periféricas (Aires, 1999). Embora os fosfolipídios sejam os principais lipídios da membrana, o colesterol também compõe uma parte significativa de muitas membranas celulares. Como essas moléculas possuem uma região polar semelhante à dos fosfolipídios, elas são hidrofóbicas. Conseqüentemente, elas próprias se inserem dentro da porção central da bicamada lipídica. Cada célula possui de 10 a 50 tipos diferentes de proteínas inseridas dentro da bicamada fosfolipídica. Anatomicamente, as proteínas da membrana são descritas como sendo ou *proteínas associadas (extrínsecas)* ou *proteínas integrais (intrínsecas)*. As proteínas intrínsecas ou integrais são proteínas que atravessam totalmente a membrana – *Transmembrana*. Muitas das proteínas transmembrana que são fisiologicamente importantes possuem 7 segmentos transmembrana, enquanto outras apenas 1 ou até mais de 12. Quando as proteínas cruzam a membrana mais de uma vez, as cadeias de aminoácidos entre as seções que atravessam a membrana produzem protrusões para dentro do citoplasma e para dentro do fluido extracelular. Carboidratos ligam-se às alças extracelulares. Grupos fosfatos podem ligar-se a alças intracelulares, sendo este um método que a célula usa para alterar a função das proteínas.

Para os fisiologistas, a classificação das proteínas de membrana pela sua função é muito mais útil do que pela sua estrutura. As proteínas da membrana celular funcionam como: (1) *proteínas estruturais*, (2) *enzimas*, (3) *receptores* e (4) *transportadores*, que movem moléculas para dentro e para fora da célula.

A célula cardíaca apresenta ainda uma camada mais externa denominada Glicocálice. Tal camada é constituída principalmente de carboidratos complexos denominados polissacarídeos, com freqüência associados com proteínas (glicoproteínas). Estas últimas apresentam carga elétrica negativa que atuam capturando íons carregados positivamente tais como os íons cálcio, sódio e magnésio (Bennett, 1963). Assim sendo, a bicamada lipídica está imediatamente próxima ao glicocálice e é usualmente relacionada como o único verdadeiro componente da membrana (sarcolema) constituindo-se, portanto, em um contorno de bicamada de moléculas fosfolipídicas (Curry, 1986) (**Figura 2**).



**Figura 1- O Músculo Cardíaco.** À esquerda observamos o aspecto externo do coração com seus principais componentes. Os ventrículos ocupam a maior parte do coração. Todas as artérias e vasos ligam-se à base do coração. À direita podemos observar uma fotomicrografia de um miócito cardíaco ventricular isolado pela técnica de separação por enzimas. Adaptado de Silverthorn,D.U., 2003.



**Figura 2- A Membrana Celular.** A membrana celular é uma camada dupla de moléculas de fosfolipídios. Proteínas de vários tipos estão inseridas e atravessando completamente a bicamada fosfolipídica, e os carboidratos ligam-se a proteínas e lipídios na superfície externa – Glicocálice. Adaptado de Silverthorn, D.U., 2003.

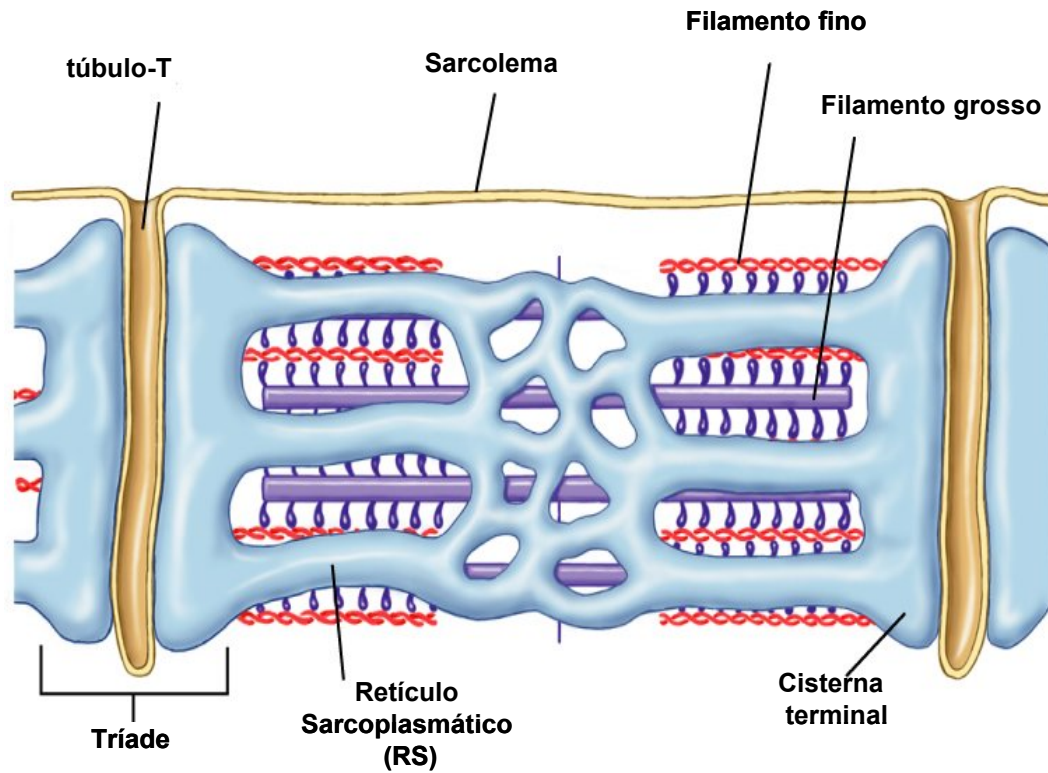


## 1.2- Túbulos-T

Nos sarcolemas dos miócitos cardíacos encontramos invaginações, que penetram as células percorrendo-as transversalmente e emitindo ramificações. Estas invaginações são denominadas *Túbulos Transversos* ou *Túbulos-“T”*. Por outro lado, outras pequenas depressões na membrana não conseguem se caracterizar como tal e, vão constituir as denominadas de *Cavéolas*. Pelo fato dos túbulos-T serem uma extensão e de apresentarem a mesma ultraestrutura do sarcolema, eles aumentam a área de superfície da célula em cerca de 30%, facilitando assim que o estímulo excitatório se propague para dentro da célula (Scales, 1981). A organização ultraestrutural do sarcolema cardíaco é importante porque este é o local através do qual o cálcio entra e sai da célula. Assim, a localização de relevantes sistemas de transporte é de importância fundamental. Este é particularmente o caso de existir uma distribuição diferenciada de canais iônicos, bombas e outras especializações da membrana (Almers & Stirling, 1984) (**Figura 3**).

## 1.3- Retículo Sarcoplasmático (RS)

Anatomicamente, o *Retículo Sarcoplasmático (RS)* se constitui em uma rede espalhada através dos miócitos cardíacos e demarcada por sua bicamada lipídica similar àquela do sarcolema (Page et al., 1971). A principal função dessa organela parece ser o seqüestro e a liberação de cálcio para o citoplasma (Winegrad, 1965). As extremidades do RS se encontram próximas e em aposição aos túbulos-T. Nesse local, os túbulos do RS se expandem em projeções em forma de bolsas, as quais se estendem ao longo da superfície interna do sarcolema ou estão dobrados em torno dos túbulos-T. Essas áreas expandidas do RS recebem denominações tais como; *cisterna subsarcolemal* ou *componentes juncionais*. A conexão entre o RS e o Túbulo Transverso é denominada de *Tríade*, enquanto que a conexão entre o RS e a cavéola é denominada de *Díade* (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Exceto pelas junções entre o RS e o sarcolema, a membrana do retículo sarcoplasmático parece homogênea e contém principalmente a Bomba de Cálcio-ATPase (SERCA) (Stewart & MacLenann, 1974; Katz et al., 1986). Assim, a maior parte da superfície do retículo sarcoplasmático parece funcionar basicamente para a remoção do cálcio do citoplasma (Franzini-Armstrong, 1975) (**Figura 3**).



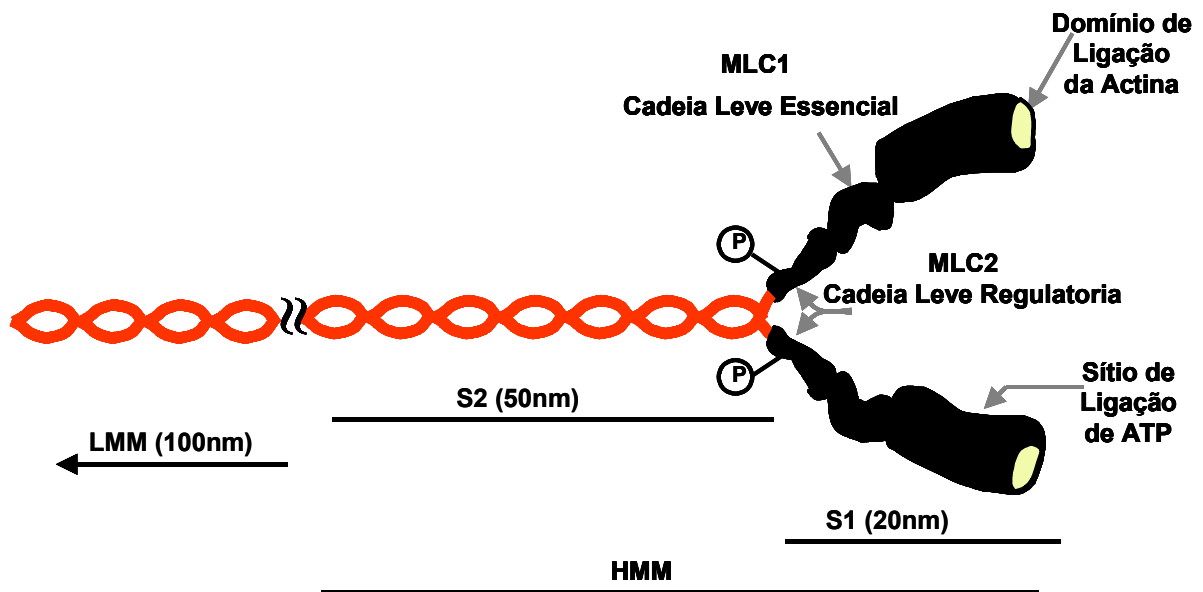
**Figura 3- Túbulos-T e o Retículo Sarcoplasmático.** O retículo sarcoplasmático engloba cada miofibrila. O sistema de túbulos-T está intimamente associado com o retículo sarcoplasmático. Adaptado de Silverthorn, D.U.,2003.

#### 1.4- Sarcômero e Miofilamentos

A principal função do miócito cardíaco é o processo de contração e relaxamento muscular. O *sarcômero* é considerado como uma unidade contrátil básica do miócito e é limitado por duas *linhas* ou *discos Z*.

Para o desempenho dessas funções, contribuem estruturas altamente especializadas denominadas *Miofilamentos* ou *Filamentos Contráteis*. Por sua vez, tais miofilamentos são constituídos pelos filamentos grossos contendo *Miosina* e pelos filamentos finos contendo *Actina* bem como pelos componentes contráteis do citoesqueleto (Page *et al.*, 1971; Page, 1978).

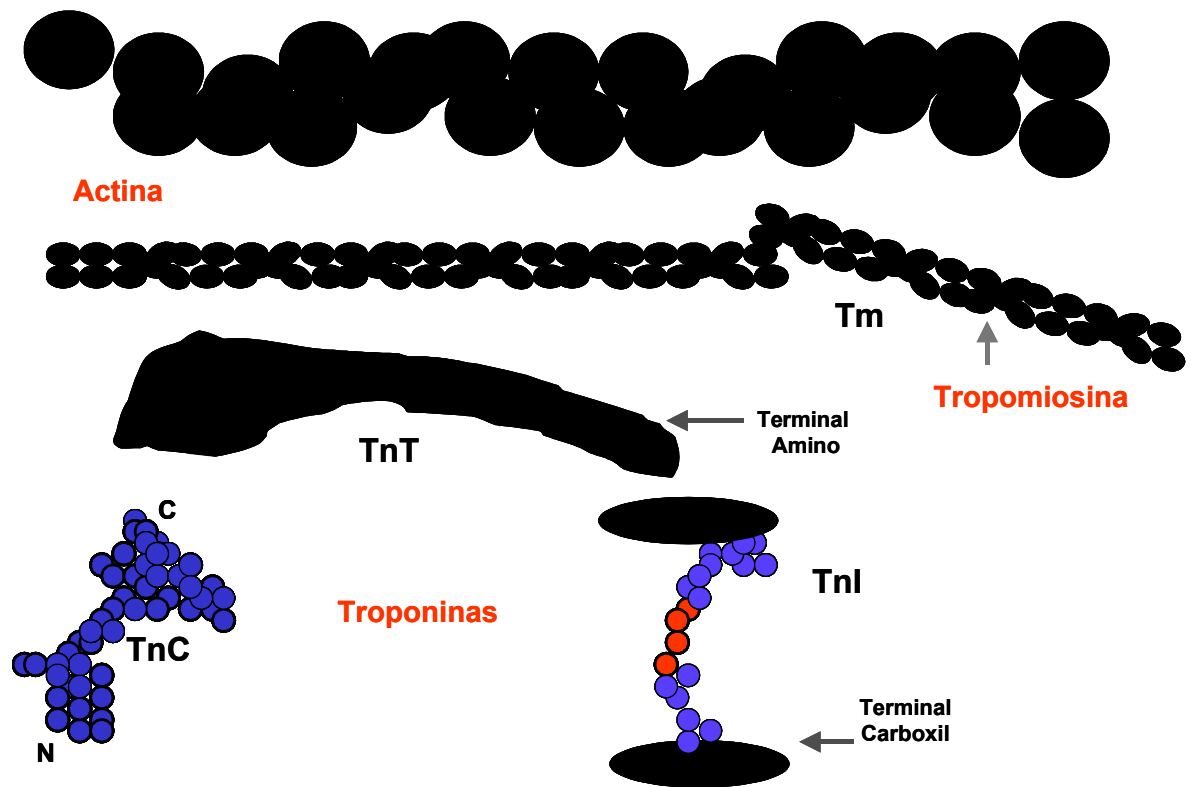
Cada filamento grosso é constituído por ~300 moléculas de miosina, mas também contêm outras proteínas tais como a *titina* e a *proteína-C*. Cada cadeia pesada de miosina (MW ~450.000) tem uma longa (~130nm) cauda  $\alpha$ -helicoidal e uma cabeça globular (Warshaw, 1996). As caudas da cadeia pesada de miosina formam o eixo principal do filamento grosso. Essas cabeças de miosina formam as *pontes cruzadas* que interagem com a actina para a geração da contração (Offer, 1972; Freiburg & Gautel, 1996). Essas cabeças contêm sítios para a hidrólise do ATP, e têm duas cadeias leves associadas com cada cabeça. Com base na susceptibilidade a proteases específicas, a cadeia pesada de miosina tem sido desdobrada em *meromiosina leve* (LMM, 2/3 dos 150 nm da cauda) e *meromiosina pesada* (HMM). A HMM é posteriormente dividida em *subfragmento 2* (S2, os 50 nm residuais da cauda) e *subfragmento 1* (S1, 20 nm do pescoço e longa cabeça. A região central do filamento grosso é desprovida de pontes cruzadas refletindo a relação cauda-a-cauda das moléculas de miosina (Warshaw, 1996). As duas cadeias leves de miosina (*MLC1* e *MLC2*) se ligam a cada cadeia pesada na base do domínio S1 ou na região do pescoço. *MLC1* é também referida como *cadeia leve alcali* ou *essencial* (ELC). *MLC2* é também chamada de *cadeia leve fosforilável* ou *regulatória* (RLC). Ambas as cadeias leves conferem estabilidade física ao filamento grosso. Entretanto, a cadeia leve regulatória (*MLC2*) pode também alterar a função em resposta a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  ou fosforilação (Warshaw, 1996). As proteínas do filamento fino e suas interações foram revisadas por Zot & Potter (1987); e por Solaro & Rarick (1998) (**Figura 4**).



**Figura 4- Miofilamentos: Miosina.** A molécula de miosina tem aproximadamente 170 nm de comprimento e apresenta duas cabeças globulares (S1) e caudas (incluindo a meromiosina leve LMM + S2), as quais se apresentam como uma cauda entrelaçada. As duas cadeias leves (MLC) estão indicadas na região do pescoço. (Adaptado de Warshaw, 1996).

O filamento fino é constituído por duas cadeias da proteína globular *G-actina* a qual forma a dupla hélice do polímero *F-actina* (Solaro & Rarick, 1998; Rayment *et al.*, 1993 a, b; Bers, 2001). A *Tropomiosina* (*Tm*) é uma proteína longa e flexível, que se aloja na fenda formada pelos filamentos de actina e envolve cerca de sete monômeros de actina. A tropomiosina é também um duplo filamento formando uma  $\alpha$ -hélice sendo que seus dois filamentos podem estar conectados por pontes dissulfídicas (Lehrer *et al.*, 1997). A cada sétima actina existe um complexo *Troponina* (*Tn*) agregado a tropomiosina. Tal complexo troponina é formado por 3 subunidades: **a) Troponina T** (*TnT*, ou subunidade de ligação da tropomiosina), **b) Troponina C** (*TnC*, ou subunidade de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ ) e **c) Troponina I** (*TnI*, ou subunidade inibitória, que também se liga a actina). A *TnT* tem uma região carboxil globular e uma forma alongada que se estende ao longo da *Tm* sobre cerca de 3 monômeros da actina (Ohtsuki, 1979; Flicker *et al.*, 1982). A *TnI* (próxima de seu amino terminal) interage especificamente com as terminações carboxil tanto da *TnT* como da *TnC*. A forte ligação do amino terminal da *TnI* e *TnC* depende da ligação de cálcio ou magnésio aos sítios no carboxil terminal da *TnC*. Na condição de repouso (baixa  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) o carboxil terminal da *TnI* também se liga especificamente à actina, e isto evita que a cabeça de miosina interaja com a actina. Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga ao amino terminal da *TnC*, no sítio regulatório de menor afinidade fisiológica, esta parte da *TnC* se liga ao carboxi terminal da *TnI* induzindo a dissociação da *TnI* da actina. Com isso, a *TnT* induz um movimento da tropomiosina o qual, por sua vez, permitirá a interação da miosina com a actina (Solaro & Rarick, 1998; Rayment *et al.*, 1993 a, b) (**Figura 5**).

Na microscopia eletrônica, o local onde os filamentos de actina e miosina se sobrepõem é denominado *banda A* (*anisotrópica*), a qual se mostra escura na microscopia; em contraste com as zonas mais claras ou *bandas I* (*isotrópicas*) em ambos os lados, a qual contém apenas filamentos finos. No centro da banda A tem uma zona conhecida como *zona H*. Aqui apenas a miosina está presente, porque a sobreposição entre os filamentos finos e grossos termina próximo a esta zona. Cada zona H contém uma região central escura, a *linha-M*. Os filamentos grossos estão interconectados transversalmente na linha-M pela *proteína -M* e pela *miomesina* (Rayment *et al.*, 1993a; Obermann *et al.*, 1995). Uma outra proteína denominada *titina* apresenta uma estrutura extremamente longa e se projeta através do filamento grosso, desde a linha-M até a linha-Z (Gautel & Goulding, 1996).



**Figura 5- Miofilamento: Actina.** Desenho representativo do complexo estrutural da actina. (Adaptado de Solaro & Rarick, 1998).

## 2 – Regulação da Atividade das Proteínas Contráteis

A regulação primária da contração do músculo estriado e cardíaco de mamífero ocorre no filamento fino. Quando o cálcio livre citosólico se eleva, ele se liga ao complexo troponina, o qual, por sua vez, altera o filamento fino de forma a possibilitar que a miosina se combine com a actina e gere tensão. A ocupação da troponina C pelo cálcio, fortalece a ligação entre a troponina C e a troponina I e, dessa forma, diminuindo a interação negativa da troponina I com a actina, causando uma alteração molecular na tropomiosina, a qual se torna menos inibitória à interação actina-miosina (Brenner, 1988; Rüegg, 1990) (**Figuras 6 e 7**).

De acordo com Brenner (1988), é predominantemente a frequência de ligação de pontes cruzadas que é afetada pelo cálcio. Dessa forma, qualquer aumento na concentração de cálcio livre no mioplasma poderá aumentar a ocupação da troponina C pelo cálcio o que, por sua vez, aumenta a probabilidade de ligações de pontes cruzadas. Portanto, o primeiro efeito dos íons cálcio poderia ser um aumento da força desenvolvida (Rüegg, 1990).

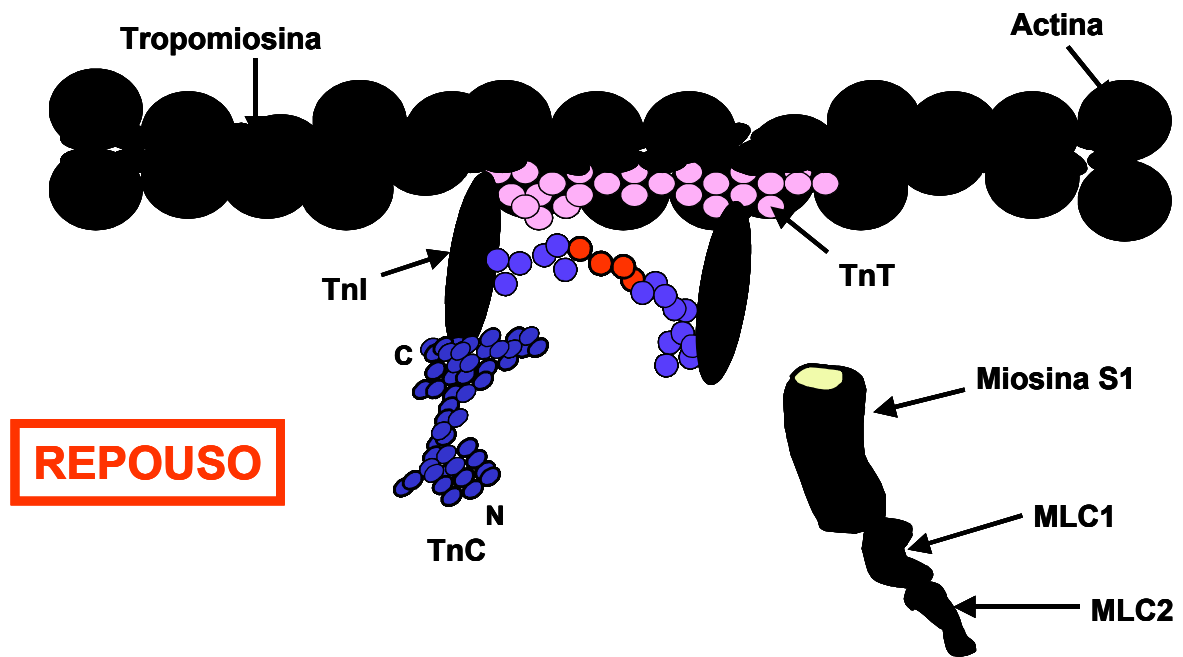
Em contraste, Hancock et al.; (1993) propuseram que os íons cálcio interagindo com a troponina C atuariam mais aumentando a disponibilidade de sítios de ligação para a miosina no filamento de actina do que alterando a frequência de transição entre os estados das pontes cruzadas. Na verdade, essas duas propostas, aparentemente divergentes, não seriam tão diferentes, visto que o cálcio promove a ligação da miosina à actina, um efeito que também altera a configuração molecular da cabeça da miosina e, em consequência, o grau de interação miosina-actina (Rayment et al.; 1993).

Normalmente, a concentração mioplasmática de íons cálcio durante a sístole é tal que os sítios contráteis estão ativados em 50% de sua totalidade. Dessa forma, o coração tem ainda uma considerável reserva contrátil, a qual poderia ser explorada pelo aumento da ocupação da troponina C pelo cálcio. O desenvolvimento da força poderia, em última instância, depender da quantidade de cálcio liberado do retículo sarcoplasmático e ofertado a troponina C, o que poderia explicar o aumento da força de contração durante estimulação por catecolaminas (Opie, 1995). A estimulação  $\beta$ -adrenérgica atua tanto indiretamente através do AMPc ou mais diretamente aumentando a concentração citosólica de cálcio através do aumento da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  e pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Um aumento da frequência de ligação de pontes cruzadas aumenta a velocidade de desenvolvimento de tensão,

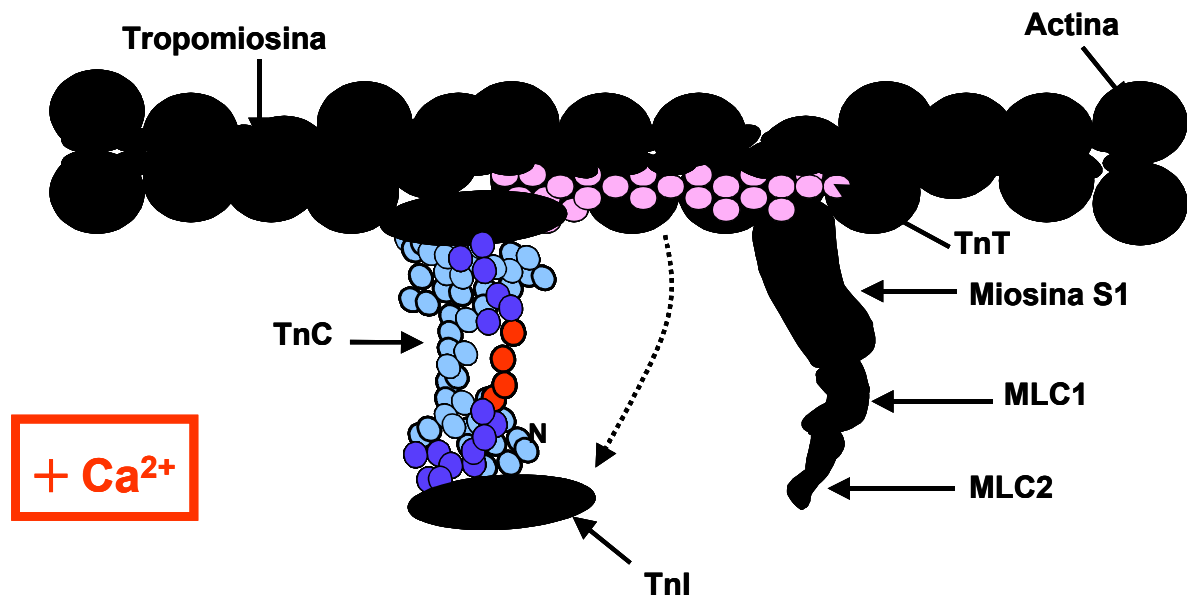
$dF/dt$ . Este é o efeito inotrópico positivo. A velocidade de relaxamento,  $(-dF/dt)$  também será aumentada. Este efeito lusitrópico é explicado por dois fatores: primeiro, a fosforilação do fosfolamban ativa o transporte de cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático de tal forma, que o cálcio livre citosólico será diminuído mais rapidamente na presença de catecolaminas (Katz, 1979) e, segundo, a ativação  $\beta$ -adrenérgica diminui a sensibilidade do miofilamento ao cálcio devido a fosforilação da TnI e a conseqüente redução da afinidade da TnC ao cálcio (Katz, 1979; Li *et al.*, 2000).

A velocidade da constante de dissociação do complexo troponina C- $Ca^{2+}$  é grandemente aumentado quando a troponina I é fosforilada pela PKA (Holroyde *et al.*, 1980). O significado fisiológico dessa fosforilação é o fato de que a contração pode ser desativada mais rapidamente quando o cálcio diminui no início da diástole, o que contribui para um aumento do relaxamento. A troponina T também pode desenvolver uma fosforilação similar em resposta a estimulação pela proteína quinase C (PKC), sendo esta última formada no sistema de sinalização desencadeado por estimulação  $\alpha_1$ -adrenérgica. Tal fosforilação da troponina T fornece resultados inibitórios similares àqueles obtidos pela fosforilação da troponina I (Holroyde *et al.*, 1980).





**Figura 6 – A Condição de Repouso.** Na condição de repouso, o Carboxi terminal da TnI está ligado à actina, desta forma, ancorando o complexo TnT-tropomiosina (Tm) e, impedindo que a cabeça da miosina (S1) se ligue à actina (Adaptado de Solaro & Rarick, 1998).



**Figura 7 – Os Miofilamentos em Presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga ao terminal amino da TnC, esta região se liga fortemente ao terminal carboxil da TnI, a qual se desloca da actina permitindo que o complexo TnT-Tm se desloque para o fundo da fenda formada pela actina e, conseqüentemente, exponha os sítios situados ao longo da actina aos quais irão interagir com sítios de ligação do subfragmento das cabeças S1 da miosina. (Adaptado de Solaro & Rarick, 1998).

### **3 – Biologia Molecular dos Canais de Cálcio dos Miócitos Cardíacos**

Os íons cálcio são importantes mensageiros intracelulares do sistema cardiovascular. A homeostase do cálcio é regulada através: (1) de um ciclo extracelular, o qual controla a entrada e a remoção do cálcio entre o citosol e o espaço extracelular; (2) e um ciclo intracelular, o qual controla os fluxos entre o citosol e o retículo sarcoplasmático. A sinalização do cálcio no sistema cardiovascular é mediada por diversas famílias de proteínas. Tais processos incluem as proteínas que regulam a entrada do cálcio no citosol, as proteínas que reconhecem o cálcio assim que ele entra no citosol e, as proteínas que removem o cálcio do citosol. As proteínas que regulam o fluxo de cálcio para dentro do citosol incluem os canais de liberação do cálcio intracelular e os canais de cálcio da membrana plasmática (Katz, 1996a, b).

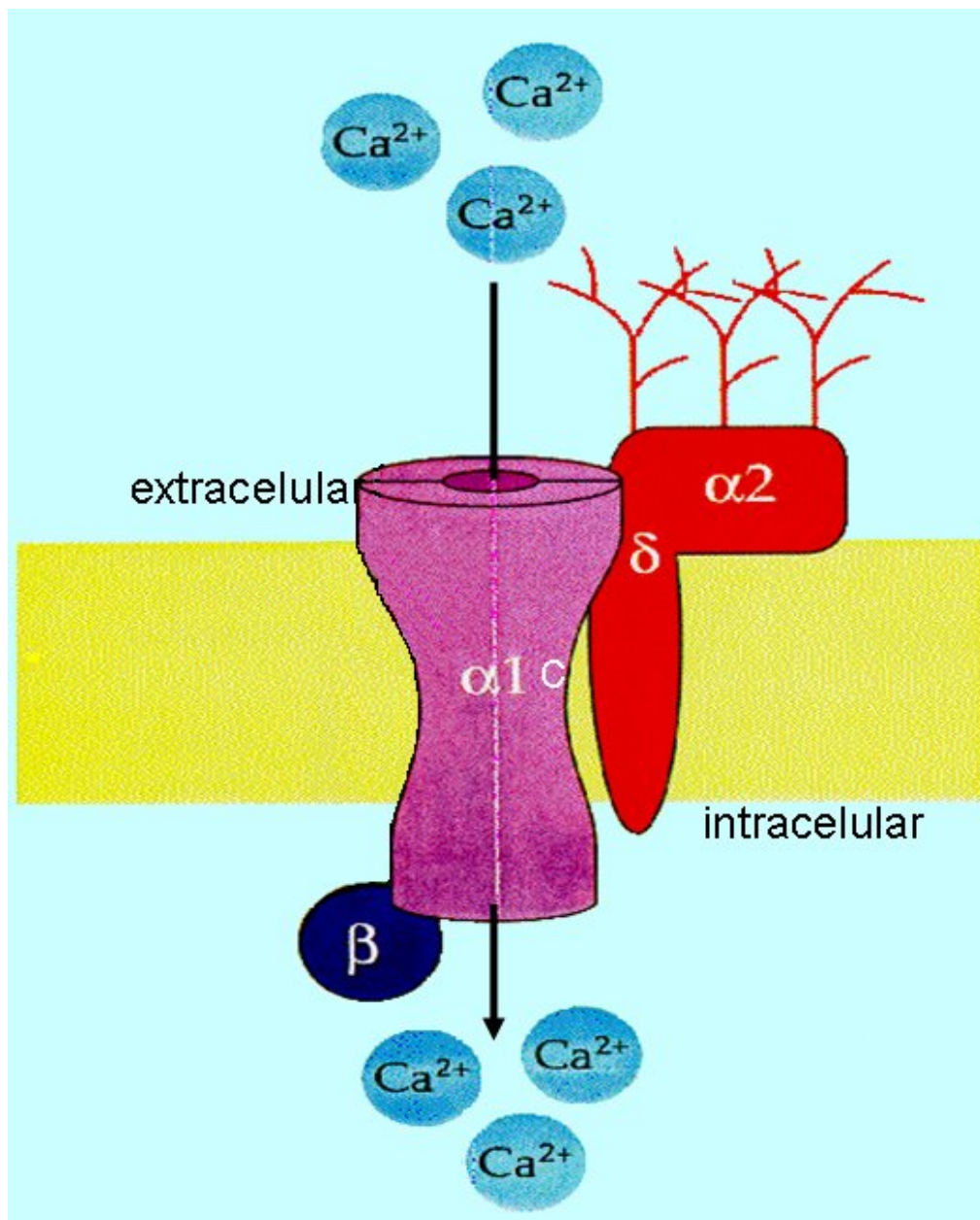
#### **3.1- Proteínas que Regulam o Influxo Celular de Cálcio**

Duas famílias de proteínas regulam a entrada de cálcio para dentro do citosol: **a)** Uma família inclui os canais de liberação de cálcio intracelular (do RS) e, **b)** a outra família constitui os canais de cálcio da membrana plasmática.

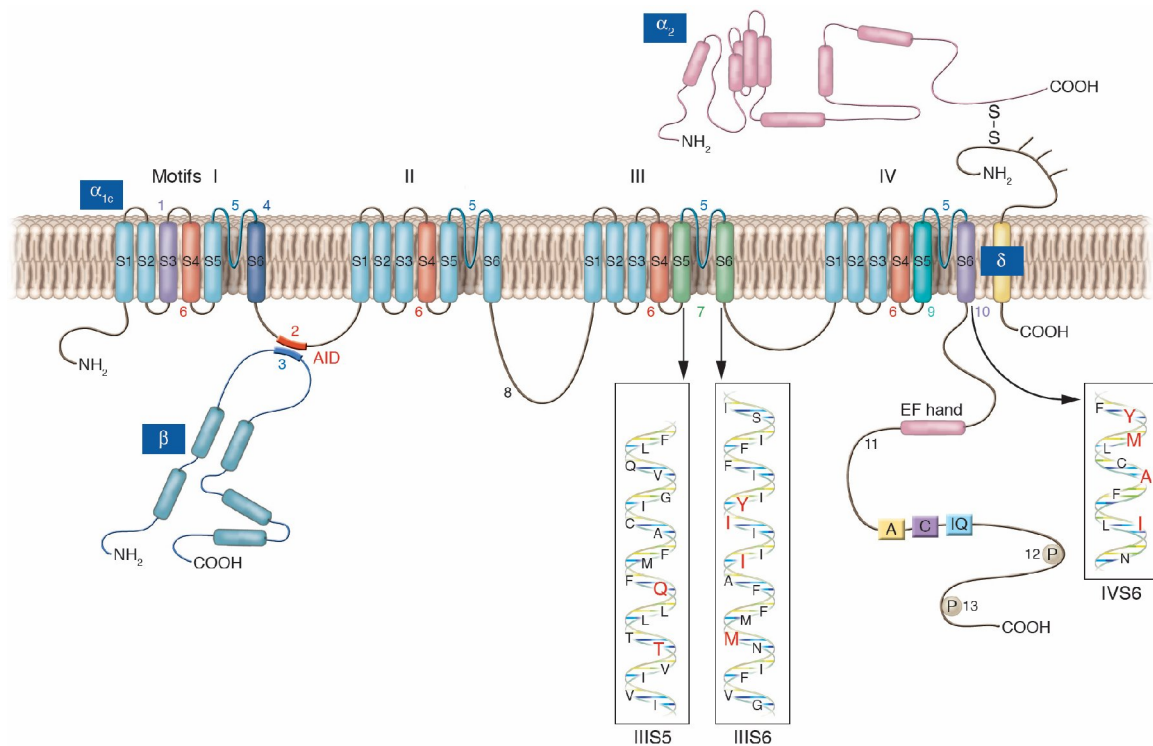
##### **I) Canais de cálcio da membrana plasmática**

O cálcio entra na célula através dos canais de cálcio voltagem-dependentes localizados na membrana plasmática os quais, participam do ciclo extracelular do cálcio. Os canais de cálcio tipo-L da membrana plasmática são os mais abundantes membros dessa família nos miócitos cardíacos e contribuem tanto para a formação do “*plateau*” como para o acoplamento excitação-contração (Katz, 1996a, b) (Tsien & Tsien, 1990) (**Figuras 8 e 9**).

Os canais de cálcio da membrana plasmática são membros de uma grande família de canais iônicos onde se incluem os canais de sódio, os canais de potássio e os canais de cloreto. Todos esses canais compartilham uma estrutura muito similar.



**Figura 8 – O Canal de Cálcio.** Desenho representativo de um canal lento de cálcio mostrando suas respectivas subunidades circundando o poro central (Adaptado de Perez – Reyes & Schneider, 1995).



**Figura 9 - Estrutura Organizacional dos Canais Lentos de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Subunidade  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\delta$ . Subunidade  $\alpha_1$  formada por quatro *Motifs* e cada um deles composto por seis segmentos transmembrana. Subunidade  $\alpha_2$  com disposição não citosólica e ligada à subunidade  $\delta$  por pontes dissulfeto. Subunidade  $\delta$  com um único segmento transmembrana. Subunidade  $\beta$  com disposição citosólica, ligada por um domínio de interação peptídica citosólico a subunidade  $\alpha_1$  entre os *Motifs* I e II (Adaptado de Bodi et al., 2005).

### a) Receptores Diidropiridínicos (DHPs)

Na década de 70, com a utilização de métodos de microscopia eletrônica, foi possível identificar uma proteína, transmembrana, classificada como um polipeptídico heterotetrâmero (Block et al., 1988) composto por 5 (cinco) subunidades, sendo  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\bar{\delta}$ ,  $\beta$  e, em alguns tecidos, também existe a subunidade  $\gamma$  (Bodi et al., 2005). No músculo esquelético os canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  são formados pelas subunidades  $\alpha_{1s}$ ,  $\alpha_2$ ,  $\bar{\delta}$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  entretanto, no músculo cardíaco o canal é formado apenas pelas subunidades  $\alpha_{1c}$ ,  $\alpha_2$ ,  $\bar{\delta}$  e  $\beta$ , sendo que a subunidade  $\alpha_1$  é acrescida da letra “s” para definir os canais de Músculo Esquelético (Skeletal Muscle), e acrescida da letra “c” para definir os canais de Músculo Cardíaco (Cardiac Muscle) (Bodi et al., 2005).

A subunidade  $\alpha_{1c}$  (170-240 kDa) consiste de 4 (quatro) *motifs* homólogos (I-IV) sendo que cada *motifs* é formado por 6 (seis) segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélice, definidos com S1, S2, S3, S4, S5 e S6. Entre os segmentos S3 e S4 encontra-se a seqüência peptídica responsável pela ativação cinética do canal. Tal seqüência peptídica tem característica voltagem-dependente e o segmento S4 é considerado como sendo o sensor de voltagem. Os segmentos S5 e S6, quando ativados pela alteração de voltagem da membrana, sofrem uma alteração em sua conformação protéica com conseqüente formação de um canal seletivo a íons, mais especificamente, a íons  $\text{Ca}^{2+}$ . No segmento S6 encontra-se a seqüência peptídica responsável pela inativação do canal (Tsien & Tsien, 1990; Cheng et al., 1993). A comunicação entre os *motifs* ocorre através de uma ligação peptídica citosólica entre S6 e S1 do *motifs* seguinte. A seqüência peptídica de ligação entre os motifs I e motifs II também tem função de união entre a subunidade  $\alpha_{1c}$  e  $\beta$  (Bodi et al., 2005; Yokoyama et al., 2005).

A subunidade  $\alpha_2$ , com localização extracelular (Ahlijamian et al., 1990), esta ligada a subunidade  $\bar{\delta}$  por interação na superfície celular através de pontes dissulfeto. A subunidade  $\bar{\delta}$  é formada por um único segmento transmembrana junto ao *motifs* IV da subunidade  $\alpha_{1c}$  (De Jongh et al., 1989). A expressão incorreta destas subunidades pode levar ao desenvolvimento de bradicardias (Ivanov et al., 2004). Quando as subunidades  $\alpha_2$  e  $\bar{\delta}$  são expressas em conjunto com a

subunidade  $\alpha_{1c}$  ocorre um incremento dos sítios de ligação do Receptor Diidropiridínico (DHPR) e das correntes iônicas (Singer et al., 1991; Wei et al., 1995; Bangalore et al., 1996). Tal fato indica que estas subunidades apresentam papel importante na formação e função destes canais na superfície da membrana (Bers, 2001) aumentando a afinidade do canal ao composto diidropiridínico (Wei et al., 1995).

Quatro isoformas da subunidade  $\beta$  foram descritas ( $\beta_1$  -  $\beta_4$ ), entretanto a isoforma encontrada no músculo cardíaco é  $\beta_2$  (De Waard et al., 1994; Perez-Reyes & Schneider, 1995;). São estruturas hidrofílicas, não glicosiladas e localizadas no citosol; não apresentam segmentos transmembrana e ligam-se à subunidade  $\alpha_{1c}$  entre os *motifs* I e II (De Warrrd et al., 1994) (**Figuras 8 e 9**).

## **II- Canais de cálcio da membrana do retículo sarcoplasmático**

### **a) Receptores de Rianodina (RyRs)**

Anatomicamente, o retículo sarcoplasmático (RS) se constitui em uma rede espalhada através dos miócitos e demarcada por sua bicamada lipídica similar àquela do sarcolema (Page et al.; 1971). A principal função desta organela parece ser o seqüestro e a liberação de cálcio para o citoplasma (Winegrad, 1965).

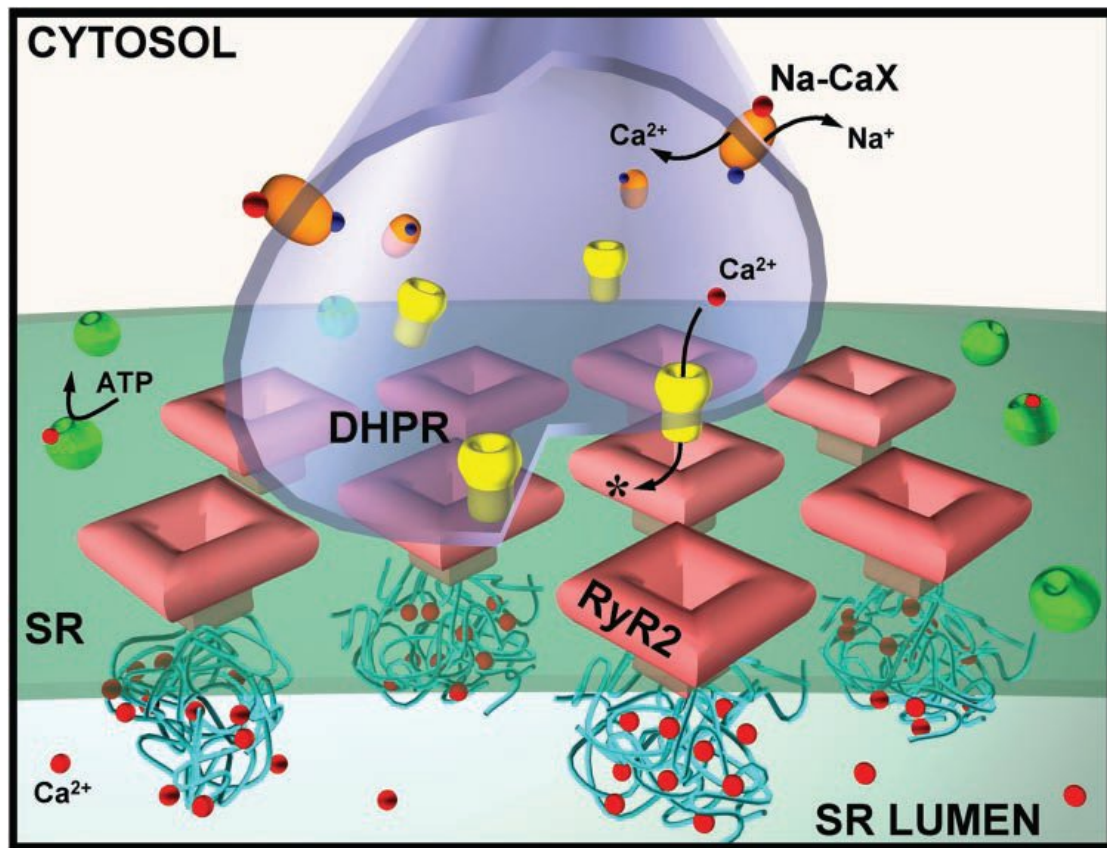
Na década de 80, através de técnicas de microscopia eletrônica, foi possível identificar a presença de estruturas protéicas transmenbranas dispostas no RS (Dulhunty, 2006). Com o uso de um alcalóide naturalmente encontrado no caule da planta *Ryanna speciosa*, denominado de rianodina, foi possível identificar a função destas estruturas (Elison & Jenden, 1967; Jenden & Fairhurst, 1969). Experimentos com a utilização deste composto alcalóide induzia a uma potente paralisação da atividade contrátil muscular, entretanto com efeitos diferentes em relação a músculos esqueléticos e músculos cardíacos. A ação deste composto sobre o músculo esquelético induzia uma paralisação total da capacidade de contração, porém em músculos cardíacos o mesmo não ocorria (Elison & Jenden, 1967; Fairhurst, 1973).

Com bases em suas diferenças morfológicas e alta afinidade pelo alcalóide rianodina, essas proteínas, uma vez purificadas, foram então identificadas, no

músculo, como canais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (receptores rianodínicos, RyR) (Lai et al.; 1988; Inui et al.; 1987a, b). Três isoformas diferentes foram identificadas inicialmente, RyR1 em músculos esqueléticos, RyR2 em músculos cardíacos, RyR3 que inicialmente foi identificado em células cerebrais, entretanto, mas tarde foram encontrados também em outros tecidos (Meissner, 1986; Inui et al., 1987).

As estruturas identificadas por Franzini-Armstrong como pés são então identificadas como os DHPR e RyR. Block et al. (1988) demonstrou que esses pés são organizados num padrão distinto no RS imediato a membrana do túbulo-T e que estão em aposição a um organizado arranjo de partículas na membrana do túbulo-T semelhante à proteína de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcolema (receptor diidropiridínico, *DHPR*). Esse arranjo em músculo cardíaco de mamífero, apresenta uma estequiometria RyR:DHPR 4:10 dependendo da espécie (Bers & Stiffel, 1993; Wibo et al.; 1991) (**Figura 10**). É importante observar também, que na musculatura esquelética os receptores diidropiridínicos não funcionam como canais de  $\text{Ca}^{2+}$  mas atuam, durante a despolarização, como elemento que promove o aumento de permeabilidade dos canais de rianodina do RS. Além disso, na musculatura esquelética, o volume de RS é significativamente maior do que no miocárdio, o que explica a grande independência da função contrátil em relação ao  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Bers & Stiffel, 1993; Wibo et al.; 1991)





**Figura 10 – Arranjo entre os DHPRs e RyRs.** Desenho esquemático identificando o túbulo transverso com os canais Diidropiridínicos (DHPRs) em sobreposição aos canais Rianodínicos (RyRs2) de músculo cardíaco. É possível também identificar o fluxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelos DHPRs em direção aos RyRs2 (Adaptado de Fill e Copello, 2002)

### **b) Receptores IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>Rs)**

A membrana do RS não compreende apenas a expressão dos RyR. Os IP<sub>3</sub>Rs (Receptores de Inositol 1,4,5-trifosfato ou InsP<sub>3</sub>Rs) também são expressos em sua membrana. Os receptores de inositol trifosfato são predominantes no músculo liso onde eles medeiam o acoplamento fármaco-mecânico. Nesse processo, a droga que se liga aos receptores da membrana libera o cálcio ativador que inicia a contração.

O receptor IP<sub>3</sub> é muito semelhante ao receptor rianodínico (RyR) e, em conjunto, eles formam uma superfamília de canais intracelulares liberadores de Ca<sup>2+</sup>. O IP<sub>3</sub>R foi inicialmente isolado do tecido neural (Supattapone et al.; 1988) e de músculo liso (Chadwick et al.; 1990). A clonagem do IP<sub>3</sub>R neuronal mostrou a existência de uma seqüência homóloga aos RyRs (Furuichi et al.; 1989; Mignery et al.; 1989). Em 1990, Chadwick et al.; mostraram que os IP<sub>3</sub>Rs têm uma estrutura quaternária como os RyRs de músculo esquelético (a despeito do menor peso molecular) e, além disso, foi sugerido apresentarem um arranjo tetramérico. Existe 3 subtipos de IP<sub>3</sub>R: tipo 1; tipo 2 e tipo 3. O tipo 1 de IP<sub>3</sub>R é predominantemente presente em músculo liso e tecido neuronal. Os tipos 2 e 3 também foram clonados e são idênticos ao tipo 1 em 69 e 64% respectivamente (Südhof et al.; 1991; Blondel et al., 1993). Estudos examinaram a expressão e a localização subcelular das isoformas do IP<sub>3</sub>R, bem como, investigaram o potencial papel deles na modulação do processo de AEC de músculo cardíaco. Análises por Western, PCR e IP<sub>3</sub>-ligação indicam que tanto os miócitos atriais como os ventriculares expressam, principalmente, o tipo 2 de IP<sub>3</sub>Rs, com uma população de aproximadamente 6 vezes mais IP<sub>3</sub>Rs nas células atriais. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que esses canais são funcionais e estão localizados nas mesmas regiões celulares que os RyRs juncionais os quais, estão envolvidos no processo de AEC (Lipp et al., 2000).

Em 1984, Hirata et al., foram os primeiros a demonstrarem a liberação de Ca<sup>2+</sup> induzida por Ca<sup>2+</sup> em vesículas de RS de músculo cardíaco. Entretanto, outros autores demonstraram nenhum efeito do IP<sub>3</sub> tanto sobre o RS isolado de músculo cardíaco quanto em miócito permeabilizado pela saponina. Em 1986, Nosek et al., demonstraram que o IP<sub>3</sub> era capaz de potencializar em músculo cardíaco tanto a liberação espontânea de Ca<sup>2+</sup> quanto a induzida por cafeína. Fabiato (1986a, b; 1990) mostrou que a rápida aplicação de IP<sub>3</sub> em miócitos desmembranados de rato

poderia induzir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas que esta seria muito menor e muito mais lenta que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo processo de CICR. Estes dados foram confirmados em trabalhos com fibras desmembranadas de músculo ventricular de rato (Kentish et al.; 1990).

O papel biológico desta família de receptores em tecidos cardíacos está pouco esclarecido. Apesar do receptor  $\text{IP}_3$  não ser o principal canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  em músculo cardíaco, o  $\text{IP}_3$  pode estar envolvido na regulação da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ . O aumento de  $\text{IP}_3$  e o resultante aumento da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser um importante mecanismo no controle da força contrátil cardíaca em resposta a fatores hormonais e farmacológicos bem como em estados patológicos (Go et al.; 1995).

No músculo cardíaco, o receptor de rianodina atua como o principal canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS no processo de acoplamento excitação-contração (Smith et al.; 1989; Gyorke & Fill, 1993). O papel do  $\text{IP}_3\text{R}$  na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  em células cardíacas ainda não está bem esclarecido. Tem sido demonstrado que a ativação do fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato o qual está acoplado aos receptores  $\alpha$ -adrenergico e muscarínico da membrana plasmática, é capaz de aumentar o nível de  $\text{IP}_3$  no músculo cardíaco (Scholz et al.; 1988). Estudos iniciais revelaram que em uma preparação vesicular de RS o  $\text{IP}_3$  era capaz de induzir uma lenta liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  bem como ativar a contração em preparações com fibra muscular ventricular desmembranada de rato e de coração de galinha (Hirata et al.; 1984).

Os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  possuem três domínios transmembrana, um sítio de ligação, um de engate e um que forma o canal (Mignery & Südhof, 1990; Südhof et al., 1991). A sequência e domínios são similares nos três tipos, entretanto são regulados diferentemente por  $\text{InsP}_3$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 11**). Os  $\text{IP}_3\text{R}$  do tipo 2, que são mais expressos nos miócitos atriais, tem grande afinidade ao composto  $\text{InsP}_3$  (Perez et al., 1997; Ramos-Franco et al., 1998), enquanto que os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  do tipo 1 tem 4 vezes menos afinidade e os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  do tipo 3 tem aproximadamente 10 vezes menos afinidade (Hagar & Ehrlich, 2000). A ativação do  $\text{IP}_3\text{R}$  também é sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  entretanto, a  $\text{Ca}^{2+}$  dependência esta associada diferentemente em relação às isoformas de  $\text{IP}_3\text{R}$ . Os  $\text{IP}_3\text{R}$  do tipo 1 tem uma surpreendente  $\text{Ca}^{2+}$  dependência, entretanto os  $\text{IP}_3\text{R}$  do tipo 2 e 3 tem um proeminente declino nessa dependência (Bezprozvanny et al., 1991). Os  $\text{IP}_3\text{R}$  do tipo 2, muito expressos em miócitos

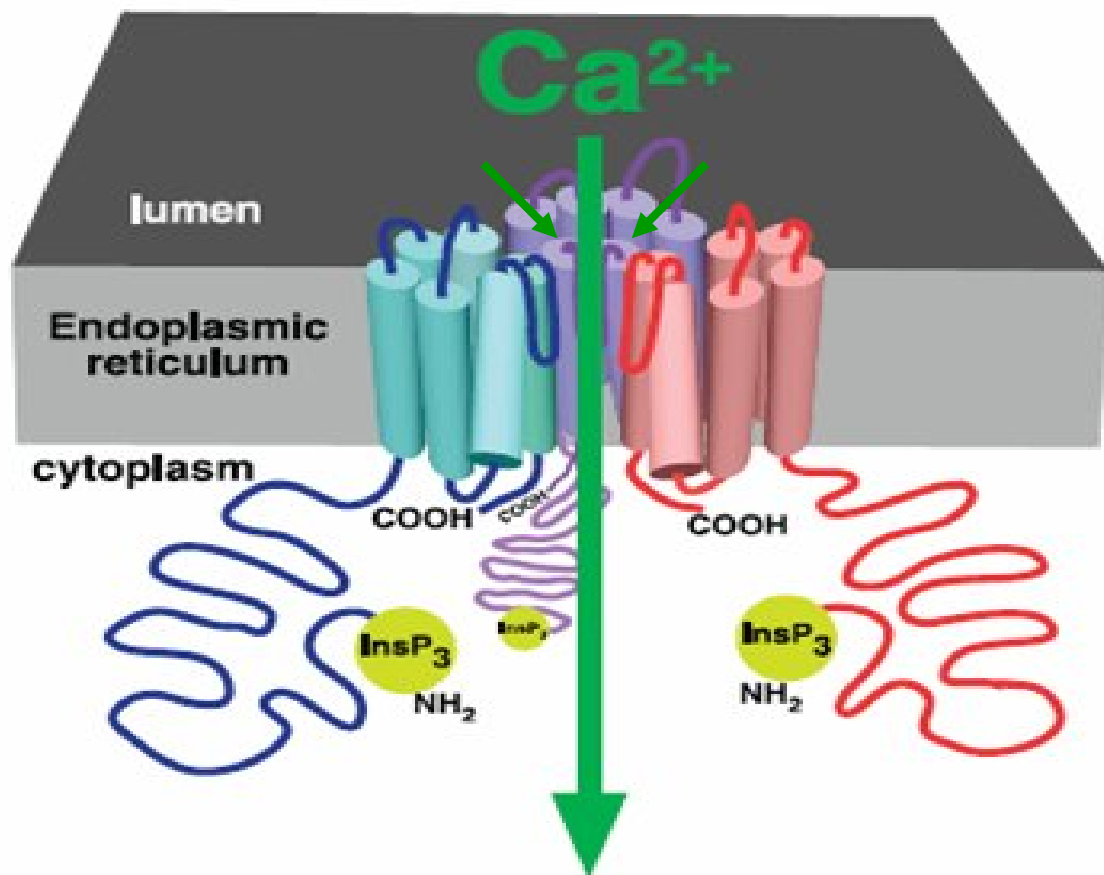
cardíacos, especialmente, em átrios, são muito mais sensíveis ao  $\text{InsP}_3$  e quase insensíveis as alterações fisiológicas da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , atuando assim, nos miócitos cardíacos, mais como um sensor de  $\text{InsP}_3$  (Bers, 2001).

A capacidade de condutância do canal  $\text{IP}_3\text{R}$  é aproximadamente metade da encontrada em canais  $\text{RyR}$ , entretanto a seletividade para cátions bivalentes, como é o caso dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , é similar a encontrada nos canais  $\text{RyR}$  (Bezprozvanny & Ehrlich, 1995). Um potente regulador da ativação destes canais, de forma inibitória, é a heparina, que tem capacidade de alterar a conformação protéica dos sítios de ligação impedindo a sensibilização via  $\text{InsP}_3$ . Por outro lado, as Proteínas Dependentes de cAMP (PKA) que são fosforilativas, são capazes de aumentar a sensibilização dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$  induzida por  $\text{InsP}_3$ , entretanto não se sabe mais sobre outras proteínas de fosforilação (Burgess et al., 1991). Além disso, a FKBP é capaz de ligar-se aos sítios de ligação do  $\text{InsP}_3$  diminuindo a sensibilização dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$ , formando então um complexo FKBP- $\text{IP}_3\text{R}$  calcineurina (Cameron et al., 1995). Calmodulina é outra proteína regulatória da atividade dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$ , com sítios de ligação nos tipos 1 e 2 (Yamada et al., 1995).

A ligação do  $\text{InsP}_3$  com os canais  $\text{IP}_3\text{R}$  ocorre no domínio transmembrana denominado de *sítio de ligação* que foi inicialmente caracterizado a partir de seu amino terminal ( $\text{NH}_2$ ) por Mignery e col (1989) e baseado na descoberta de 410 resíduos com característica complementar ao  $\text{InsP}_3$  (Moraru et al., 1999). Experimentos realizados após a descoberta de Mignery e col. Indicaram que esta característica do amino terminal era particular a todas isoformas de  $\text{IP}_3\text{R}$  (Sudhof et al., 1991; Maranto, 1994; Morris et al., 2002). Em 1996, Yoshikawa et al. identificaram uma sequência de 10 resíduos de arginina e lisina, distribuídos por todo o domínio, como sendo aminoácidos com papel muito importante na ligação do  $\text{InsP}_3$  ao canal  $\text{IP}_3\text{R}$ , em especial os resíduos Arg-265, Lys-508 e 511, talvez sendo, o último, o mais importante para essa ligação.

O *Poros* dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$  foi estabelecido por técnicas de imunocitoquímica e por análises de N-Glicosilação em comprimento total (Galvan et al., 1999; Michikawa et al., 1994). Os dados destes estudos aliados a uma analogia entre o modelo de canais  $\text{IP}_3\text{R}$  a partir dos canais  $\text{RyR}$ , sugeriram que o carboxi-terminal ( $\text{COOH}$ ) em  $\alpha$ -hélice estava envolvido na permeabilidade aos íons. A interação entre  $\text{InsP}_3$  e seu sítio de ligação no canal  $\text{IP}_3\text{R}$ , induz alteração na conformação da proteína dos segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélices 5 e 6. Tal alteração é capaz de criar a

estrutura básica para formação do poro (Michikawa et al., 1994; Williams et al., 2001; Taylor, Fonseca e Morris, 2004). Em 1999, Ramos-Franco et al. realizaram experimentos em que induziam a supressão dos quatro primeiros segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélice dos canais  $IP_3R$  e deixando ativos apenas os segmentos 5 e 6. Mesmo sem a presença dos segmentos anteriores o canal foi formado com condutância, seletividade e propriedades que confirmaram o modelo proposto. Além disso, a homologia de seqüências entre os canais RyRs e canais  $IP_3Rs$  em relação a formação dos poros, sugerem que os estudos com RyRs são importantes para determinação molecular dos canais  $IP_3Rs$  (Boehning et al., 2001).



**Figura 11 – Estrutura Molecular dos IP<sub>3</sub>Rs.** Desenho esquemático de um IP<sub>3</sub>R. Identificando os segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélice 5 e 6 responsáveis pela formação do poro permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Observamos também, os sítios de ligação na região amino terminal, do  $\text{InsP}_3$ . (Adaptado de Foskett et al., 2007)

### 3.2 – Proteínas que Removem o Cálcio do Citosol

O RS também contém *calsequestrina*, uma proteína de grande capacidade de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Ostwald & MacLennan, 1974) a qual está especialmente concentrada na cisterna terminal (Meissner, 1975).

Duas teorias foram propostas para explicar o mecanismo de liberação de íons cálcio pelo RS: 1) empregando-se o RS isolado de músculos esquelético e cardíaco, tem-se demonstrado que essa liberação é, dentro de certos limites, função do gradiente de concentração do cálcio livre através da membrana dessas vesículas (Fabiato & Fabiato, 1975). Esses dados sugerem que o aumento da atividade de íons cálcio livre no meio citoplasmático pode promover a liberação do íon cálcio armazenado no RS. Essa é a teoria da "liberação de cálcio induzida por cálcio" (*calcium induced calcium release*) (Fabiato & Fabiato, 1977; 1983); 2) a outra teoria proposta é a que a liberação de cálcio pelo RS seria decorrente da despolarização de suas membranas. Nesta teoria, assume-se que o interior da vesícula seria polarizado positivamente em relação ao seu exterior (Constantin et al.; 1977). Todavia, esta última não tem sido aceita.

Dados visando avaliar a capacidade do RS em captar e armazenar cálcio indica que a quantidade liberada é suficiente para desencadear o processo de contração muscular e, sua recaptação, é suficiente para induzir o relaxamento muscular em coração com batimentos normais (Vaughan-Jones, 1986). Essa recaptação de cálcio pelo RS requer ATP e é bloqueado por ionóforos de íons cálcio, sugerindo a existência de uma bomba de cálcio localizada nas membranas dessa organela (Chapman, 1983; Vaughm-Jones, 1986).

### 4 – Processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC)

O acoplamento excitação-contração cardíaco é o processo desde a excitação elétrica do miócito até a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, que resultará na contração do coração (Bers, 2002). O segundo mensageiro cálcio é essencial na atividade elétrica cardíaca e é o ativado direto dos miofilamentos que causam a contração (Bers, 2002). Numa visão geral, o processo de AEC pode sugerir eventos que levam até a finalização do movimento contrátil, entretanto, a conceitualização correta do processo de AEC corresponde a todos os eventos iniciados com a

despolarização da membrana, seja em células musculares esqueléticas, lisas ou cardíacas, até a resultante liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (Dulhunty, 2006).

Dessa forma, a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS é de importância crucial para o processo de AEC tanto, que já tem sido relatado que alterações da concentração de cálcio no miócito é a causa central tanto da disfunção contrátil como de arritmias em condições patofisiológicas (Sordahl et al., 1973; Pogwizd et al., 2001).

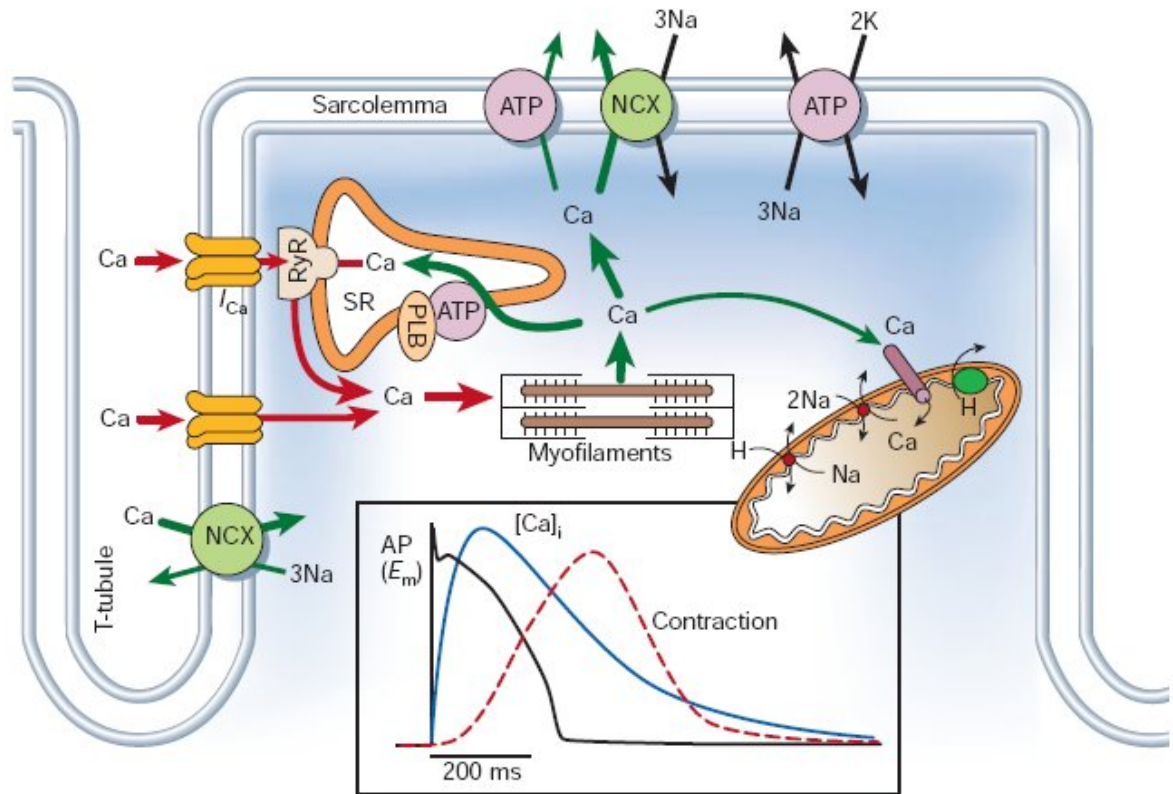
No músculo cardíaco o principal mecanismo envolvido na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  através do RS é receptor ou canal de rianodina,  $\text{RyR}_2$  (Ogawa, 1994; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997) (**Figura 12**)

Numerosas estruturas celulares estão envolvidas no processo de AEC de músculo cardíaco, mas como já mencionado, os eventos iniciam-se com a despolarização da membrana, que pode ser tanto elétrica (voltagem dependente) quanto por ação química (ligante dependente). Nos miócitos cardíacos, a despolarização da membrana desencadeia alterações conformacionais que abrem os canais de cálcio voltagem-dependentes (DHPRs) os quais possibilitam o cálcio a se difundir rapidamente para dentro da célula (Katz, 1992; Clapham, 1995). Apenas uma pequena quantidade de cálcio que entra no citosol a partir do espaço extracelular ativa o miocárdio adulto já que, a maior parte deste cálcio “ativador” se acumula logo abaixo da membrana plasmática, adjacente aos canais liberadores de cálcio localizados no retículo sarcoplasmático (RyRs). Esta área localizada, com alta concentração de cálcio, dispara a liberação de uma ainda maior quantidade de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático, mecanismo esse identificado com “liberação de cálcio induzida por cálcio” (*calcium-induced calcium release, CICR*) (Clapham, 1995; Fabiato, 1983). O cálcio presente, nesse momento no citosol, é considerado como aquele responsável pela ativação dos miofilamentos contráteis (Clapham, 1995; Fabiato, 1983).

Uma segunda via tem sido proposta com um mecanismo que contribui ao mecanismo de CICR cardíaco, o *trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$*  (Bridge et al., 1990). Este trocador, representa um mecanismo pelo qual os movimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema estão acoplados a movimentos recíprocos de  $\text{Na}^+$ ; com uma estequiometria de  $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$  (Brenner, 1993). A direção na qual se realiza a troca depende fundamentalmente do gradiente eletroquímico para o  $\text{Na}^+$  e para o  $\text{Ca}^{2+}$ . Na condição de repouso (diástole) o trocador utiliza o gradiente eletroquímico que favorece a entrada de  $\text{Na}^+$  para célula e a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  desta atuando, portanto,



nesse momento, como uma via de saída do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Nessa condição, é dito que o trocador estaria atuando no seu modo direto ou *forward*. Entretanto, quando ocorre a despolarização e a subsequente alteração do gradiente eletroquímico, o que induz também uma alteração na atividade do trocador, invertendo sua direção, ou seja, influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e efluxo de  $\text{Na}^+$ . Nessa condição, é dito que o trocador estaria atuando no seu modo inverso ou *reverse*. Nesse modo de atuação, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  atuaria contribuindo para o mecanismo de *liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$* . Obviamente, ao estar atuando no seu modo direto ou forward, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  estaria contribuindo para o processo de relaxamento muscular (Brenner, 1993; Sham et al., 1995).



**Figura 12 – Calcium Induced Calcium Release (CICR).** Desenho esquemático representando o processo de AEC por CICR. Canais lentos de Ca<sup>2+</sup> permitem o influxo deste íon durante a despolarização da membrana aumentando sua concentração citosólica, que por sua vez, altera a atividade do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. O cálcio citosólico ao ligar-se aos RyRs induz a liberação do Ca<sup>2+</sup> armazenado no RS (Adaptado de Bers, 2002).

Embora, via de regra o processo de AEC seja descrito como o fizemos até aqui, na verdade a variedade e a complexidade das estruturas envolvidas nesse processo nos mostram algumas diferenças e complexidades substanciais. Ao contrário do observado nos miócitos ventriculares, os miócitos atriais apresentam um pobre sistema tubular (Hüser et al., 1996; Lipp et al., 1996a, b) e o acoplamento entre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (DHPRs) localizados no sarcolema e os RyRs na porção “juncional” do RS ocorre próximo da periferia da célula (Lipp et al., 1990; Berlin, 1995; Carl et al., 1995; Hüster et al., 1996). Estudos anteriores indicaram que a elevação da concentração atrial de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre inicialmente na região subsarcolemal, seguida por um variável grau de propagação do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  para as camadas mais internas do miócito atrial (Lipp et al., 1990; Berlin, 1995; Hüster et al., 1996). A modulação espacial para a sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  é crítica para a determinação da atividade fisiológica da célula. Diferentes tipos de células dispõem sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  em área local e/ou global para que possam ativar diferentemente os processos celulares (Bootman et al., 2001; Marchant & Parker, 2000). Foi demonstrado que os cardiomiócitos atriais alteram as propriedades espaciais de suas sinalizações de  $\text{Ca}^{2+}$  para modular a contratilidade. Os ventrículos são os principais efetores do bombeamento e enchimento de forma grandemente passiva devido a pressão do retorno venoso. Entretanto, a contração dos átrios contribui com ~20% do volume de sangue ventricular antes destes se contraírem. A contribuição dos átrios ganha importância gradativamente maior com a idade ou sob condições de estresse (Mackenzie et al., 2004).

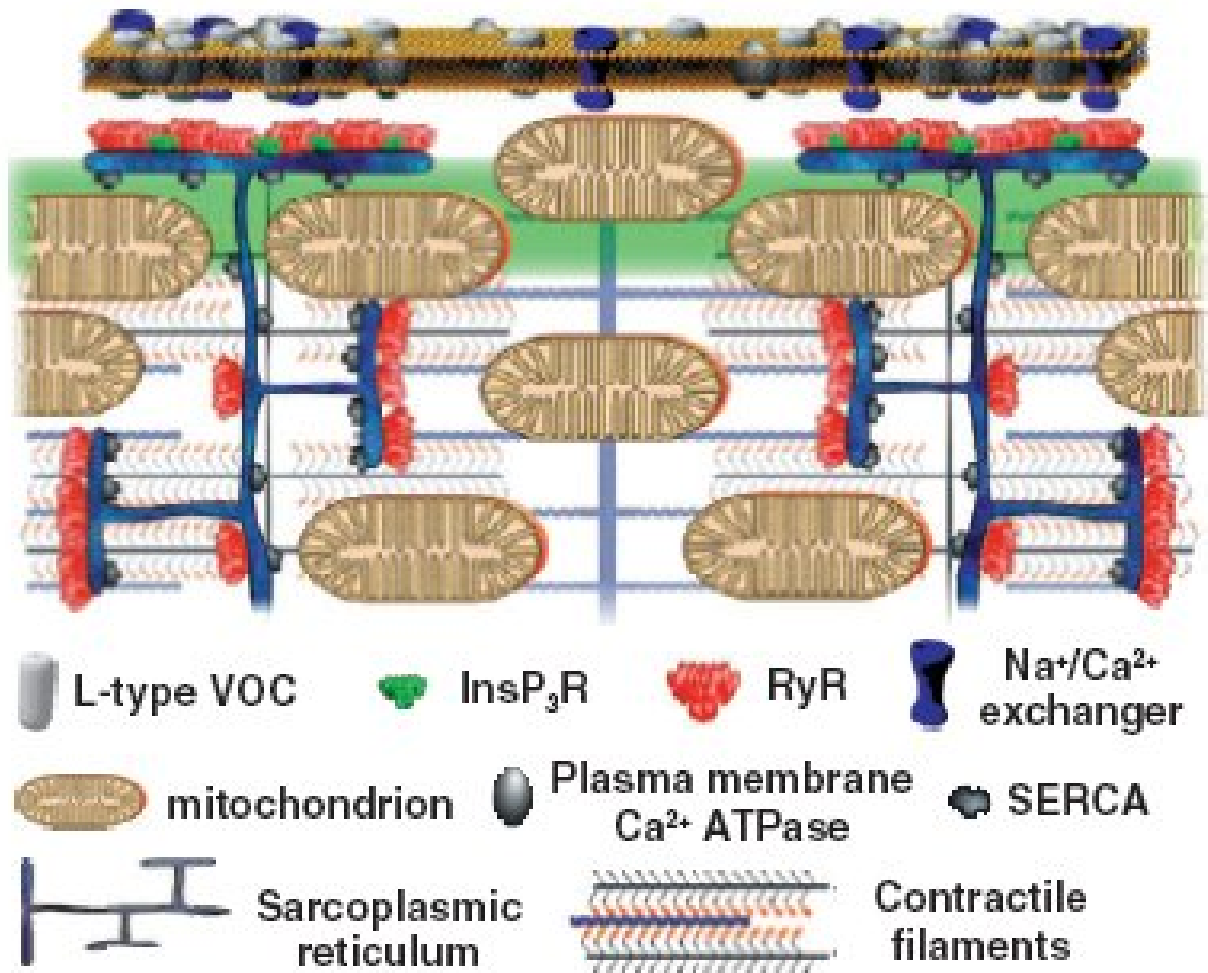
Um resumo dos elementos componentes da sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  está representado na **Figura 13**. O processo de AEC é iniciado na periferia da célula onde os DHPRs e os RyRs estão justapostos. Na maioria das células, a resposta ao  $\text{Ca}^{2+}$  está limitada ao espaço subsarcolemal. Desde que ele não ocorre nas áreas vizinhas da maquinaria contrátil, o sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  da porção juncional dispara apenas um modesto abalo. A ausência de uma propagação para o interior da resposta subsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  torna-se surpreendente já que os miócitos atriais expressam abundantemente os RyRs não-juncionais, os quais são funcionais e claramente têm acesso a estoques substanciais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os principais mecanismos que atuam limitando a difusão do  $\text{Ca}^{2+}$  são a Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA) e a mitocôndria (Mackenzie et al., 2004). A razão para que as SERCAs e as mitocôndrias afetem a propagação intracelular do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  mas não o início do

processo de CICR na periferia da célula é, muito provavelmente, à proximidade entre os DHPRs e os RyRs subsarcolemais (~ 20 nm) em comparação à distância que existe entre os agrupamentos de RyRs ao longo da célula (~2 µm). Todavia, manipulação farmacológica na sensibilidade dos RyRs através do processo de CICR, ou aumentando o fluxo do  $\text{Ca}^{2+}$  disparador, possibilitam ao sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  subsarcolemal recrutar RyRs centrais. Isto leva a uma amplificação do sinal global de  $\text{Ca}^{2+}$  resultando no aumento substancial na força de contração. Dessa forma, pesquisadores sugerem que os RyRs não-juncionais estão posicionados num local estratégico e que os habilitam a responder durante o processo de AEC (Mackenzie et al., 2004). Em condições de controle, a sensibilidade dos miócitos atriais ao processo de CICR é insuficiente para que eles sejam ativados pela quantidade limitada de  $\text{Ca}^{2+}$  que escapa do seqüestro pela SERCA e mitocôndria. Entretanto, mesmo uma modesta sensibilização, por exemplo, usando baixas concentrações de cafeína torna-os responsivos. A mesma modificação da periférica para a global sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  é responsável pelo efeito inotrópico positivo da estimulação por endotelina-1 (ET-1); agonista  $\alpha$ -adrenérgico (fenilefrina) ou agonista  $\beta$ -adrenérgico (isoproterenol). Além do mais, em contribuição ao enchimento ventricular, os miócitos atriais secretam hormônios tais como o peptídeo natriurético atrial (ANP). Dentre todos esses sinais, a via de transdução de sinal relacionando a resposta dos miócitos atriais à agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos são as menos esclarecidas. (Mackenzie et al., 2004).

Apesar da grande evidência de que o influxo de cálcio é essencial para o processo de acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco, alguns estudos têm sugerido a existência de um mecanismo voltagem-dependente de liberação de cálcio o qual não requer o influxo de cálcio (Ferrier & Howlett, 2001). Todavia, alguns importantes trabalhos têm se posicionado contrários à esta hipótese, todavia, até o momento, nada ainda foi comprovado de forma definitiva (Wier & Balke, 1999; Piacentino et al., 2000).

O Inositol (1,4,5)-trifosfato ( $\text{InsP}_3$ ) pode disparar a liberação de cálcio do RS de músculo liso bem como do retículo endoplasmático de muitos tipos de células, por meio dos receptores  $\text{InsP}_3$ . Existem receptores  $\text{InsP}_3$  nos miócitos ventriculares (basicamente isoforma 2) (Perez et al., 1997; Lipp et al., 2000). Apesar de uma elevada concentração de  $\text{InsP}_3$  poder liberar cálcio nos miócitos cardíacos

(particularmente nas células atriais, as quais apresentam muito maior expressão de receptores  $\text{InsP}_3$ ) a frequência e a intensidade de liberação de cálcio é muito menor do que o observado no mecanismo de CICR e, os potenciais de ação são sabidos não estimularem a produção de  $\text{InsP}_3$  (Kentish et al., 1990). Além disso, agonistas cardíacos  $\alpha$ -adrenérgicos e muscarínicos aumentam a produção de  $\text{InsP}_3$  e a força de contração (Brown & Jones, 1986; Pogglioli et al., 1986), todavia, esse efeito inotrópico é mediado principalmente pela proteína cinase C (PKC) do que pelo  $\text{InsP}_3$  (Endoh, 1996; Gambassi et al., 1998).



**Figura 13 - Maquinaria de Sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  nos Miócitos Atriais.** A figura mostra nos miócitos atriais, o arranjo específico dos componentes envolvidos na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  que contribuem para a geração e modulação dos sinais do  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito atrial. A banda verde do desenho delimita a zona na qual que o sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  deve cruzar no sentido de recrutar os RyRs centrais e disparar a contração. (de: Mackenzie et al., Journal of Cell Science, 117, 6327-6337, 2004).

#### 4.1– Acoplamento excitação-contração e a Via Receptores Inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>Rs)

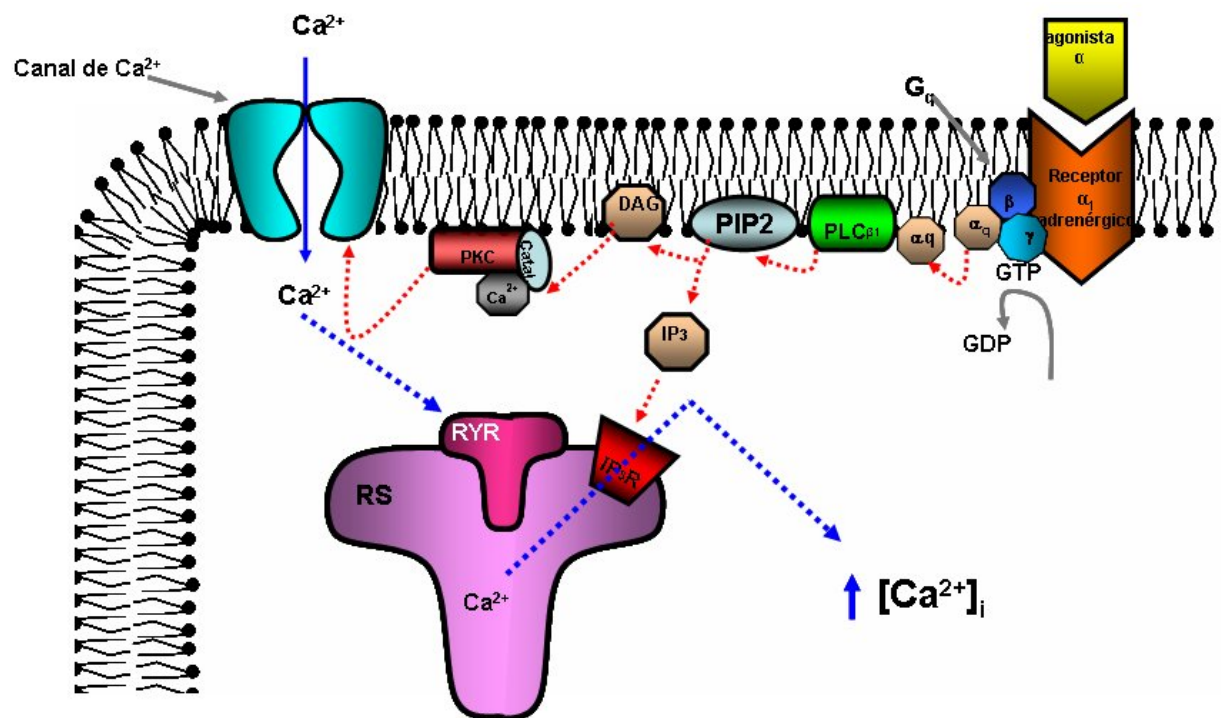
O inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) é um importante segundo mensageiro na regulação da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Berridge and Irvine, 1984; 1989). A ativação de determinados receptores da membrana plasmática acoplados à proteína G induz a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), com a conseqüente formação de IP<sub>3</sub> e à subseqüente liberação de Ca<sup>2+</sup> de estoques intracelulares. Nos últimos anos, importantes estudos têm contribuído com significativos avanços para uma melhor compreensão das bases moleculares para a liberação de Ca<sup>2+</sup> via IP<sub>3</sub>. Dentre tais avanços, podemos salientar a descoberta dos IP<sub>3</sub>Rs os quais são liberadores de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Moschella and Marks, 1993).

Tem sido demonstrado que este processo se inicia com a ativação de receptores existentes na membrana plasmática e que, em sua maioria, são formados por sete domínios trans-membrana e acoplados a um complexo heterotrimérico de proteínas G<sub>q</sub> ( $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ ). No estado inativado, estas proteínas G<sub>q</sub> estão acopladas entre si e ligadas ao difosfato de guanosina (GDP). A ligação da droga ao seu receptor específico, ativa esse complexo protéico, e a subunidade G $\alpha_q$ , então ativada, liga-se ao trifosfato de guanosina (GTP). O complexo proteína G $\alpha_q$ -GTP ativa a enzima fosfolipase C $_{\beta 1}$  (PL C $_{\beta 1}$ ), a qual é responsável pela hidrólise do lipídio de membrana fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), e a conseqüente produção de dois segundo mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e 1,2-diacylglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> difunde-se rapidamente da superfície da membrana celular até os receptores de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R), localizados na membrana do RS. A interação do IP<sub>3</sub> com o receptor induz neste uma alteração conformacional e a conseqüente liberação de Ca<sup>2+</sup> do RS para o citosol, e produz a contração. O papel tão importante do IP<sub>3</sub> no acoplamento fármaco-mecânico do músculo liso e, provavelmente do músculo cardíaco, contrasta-se com o escasso papel deste segundo mensageiro no acoplamento excitação-contração do músculo esquelético (Bezprozvanny and Ehrlich, 1995; Horowitz et al.; 1996; Karaki et al.; 1997) (**Figura 14**).

O segundo composto hidrolisado a partir do PIP<sub>2</sub> é o DAG, constituído de dois ácidos graxos e glicerol, composto este que permanece associado à membrana. O DAG ativa uma serina/treonina cinase, a *proteína cinase C* (PKC). Entretanto, a ativação da proteína cinase C necessita também da presença de um sinal de Ca<sup>2+</sup>

no citoplasma o qual promove o recrutamento da PKC para a membrana e, portanto, sua interação com o DAG. Como a ativação da PKC ocorre logo após a ativação PLC, a formação simultânea de  $IP_3$  e de DAG garante a sincronização destes dois compostos. A PKC é ativada concomitantemente por estes dois compostos. Em consequência, a PKC fosforila um certo numero de substratos, receptores, canais iônicos ou enzimas, levando uma modificação no estado funcional da célula alvo (Kamoun, Lavoinne e Verneuil, 2006). Especificamente nos miócitos cardíacos, a ação da PKC resume-se na fosforilação de um canal iônico de membrana, seletivo a íons  $Ca^{2+}$ , causando o fluxo transiente destes íons para o citosol cardíaco (Endoh, 1996; Gambassi et al., 1998; DeSantiago et al., 1998)





**Figura 14 – AEC Via Estimulação  $\alpha$ -Adrenérgica.** Desenho esquemático do processo de AEC via  $\alpha$ -adrenérgico identificando a sequência de eventos iniciados pela ligação entre o agonista e o receptor. Tal ligação induz a ativação da proteína Gs e a consequente cascata de eventos mediado pela enzima  $\text{PLC}\beta_1$ . Na sequência, ocorre a ativação dos canais de cálcio da membrana e do RS resultando, finalmente, na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol (Adaptado de Bers, 2002).

## 5 – Óleos Essenciais – Eugenol

Nativo das ilhas Molucas, o cravo junto com a pimenta do reino, canela e noz-moscada, é uma das especiarias mais conhecidas do mundo (Lavabre, 1997). O eugenol, principal componente do óleo de cravo, apresenta-se como um líquido incolor ou com coloração pálida. Tem fragrância quente, picante, característica; tal qual o cravo. Pouco solúvel em água, miscível com álcool, clorofórmio, ácido acético e óleos. Quimicamente, o eugenol é uma molécula de 2-Metoxi-4-(2-propenil) fenol; 4-alil-2metoxifenol; alilguaiacol; ácido eugênico; ácido cariofílico (Thompson et al.; 1989).  $C_{10}H_{12}O_2$ ; peso molecular= 164.2;  $d= 1.06$  (**Figura 15**).

Além de ser o principal componente do óleo de cravo, o eugenol é componente constituinte dos óleos essenciais ou extratos de muitas outras plantas, como a canela e o manjerição (Thompson et al.; 1989; Wrigh et al.; 1995). A flora brasileira apresenta uma grande variedade de plantas que guardam o eugenol e/ou seus análogos na composição de seus óleos essenciais. O gênero *croton*, por exemplo, é muito importante na flora nordestina não somente por sua larga ocorrência e dispersão nos cerrados, matas dos tabuleiros litorâneos, matas pluviais e, nas caatingas nordestinas, mas também pela sua utilidade ao homem do campo (Ducke, 1959).

No entanto, similares sintéticos derivados do petróleo, obtidos por preços menores, forçaram uma diminuição do uso dos óleos essenciais como matéria prima para a indústria internacional (Craveiro et al.; 1981). O eugenol, portanto, além de ser encontrado livremente na natureza, também pode ser adquirido comercialmente. Assim, ele é largamente utilizado na medicina popular no preparo de chás e infusatos os quais são considerados como benéficos no tratamento de algumas doenças tais como desordens gastrintestinais e diarreia crônica (Leal-Cardoso, 1994; Nishijima et al., 1998; Thompson, 1989).

Na indústria ele é empregado para acentuar o paladar de doces e bebidas, sendo ainda empregado na manufatura de cosméticos (Leal-Cardoso, 1994). Na odontologia, o eugenol é excelente para o alívio da dor induzida por pulpíte dentária. É também utilizado na terapia dentária, na forma de pasta zinco-enólica, como material capeador de polpas expostas, como restaurador provisório para cavidades sensíveis e, como material obturador de canais radiculares (Sticht and Smith, 1971; Brodin & Roed, 1984).

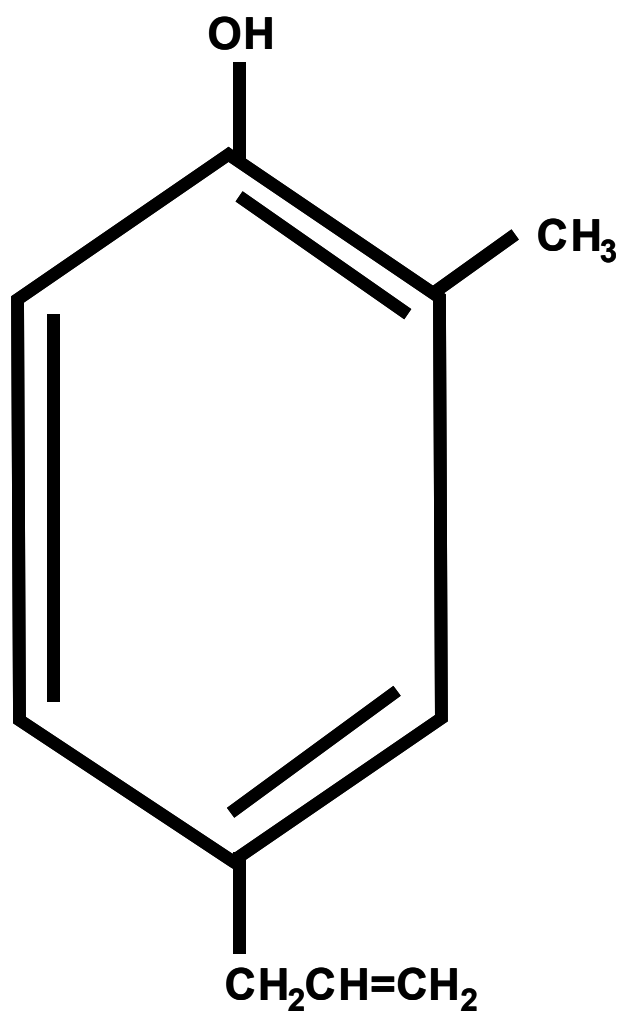


Figura 15 - Estrutura Química da Molécula de Eugenol.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho objetiva avaliar os possíveis efeitos do eugenol sobre o processo de acoplamento excitação-contração de músculo cardíaco de ratos.

Os objetivos desse trabalho foram divididos em duas etapas de estudo:

A primeira etapa do trabalho objetivou o estudo dos possíveis efeitos do eugenol sobre a atividade mecânica e a atividade elétrica do músculo atrial de rato.

A segunda etapa objetivou averiguar os possíveis efeitos do eugenol tanto sobre o aparato contrátil como sobre o mecanismo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS via  $\text{IP}_3\text{R}$  em trabéculas de músculo atrial de rato.

Em ambas as etapas, os protocolos foram desenvolvidos objetivando elucidar os possíveis mecanismos de ação do eugenol.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **1 – Preparações com músculo atrial íntegro**

Para isso, utilizamos as técnicas músculo atrial sob estimulação elétrica indireta.

1.1 – Avaliar os efeitos do eugenol em altas concentrações sobre a atividade mecânica do músculo atrial.

1.2 – Avaliar os efeitos do eugenol, em concentração única, sobre os receptor de rianodina, sobre o receptor de  $\text{IP}_3$ .

2 – Preparações com trabéculas de músculo atrial, permeabilizadas por saponina e/ou Triton X-100:

a) Sobre o complexo de proteínas musculares contráteis.

b) Liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático via RyRs e  $\text{IP}_3\text{Rs}$ .

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1– Animais**

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 250 - 300g e fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais eram mantidos em gaiolas sob condições controle de temperatura e ciclo claro - escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água. Os cuidados e o uso dos animais obedeceram às determinações “Normas de Uso e Manuseio de Animais Experimentais” da Universidade Federal do Paraná e de acordo com as recomendações da Convenção Helsing.

### **2– Protocolos Experimentais**

#### **2.1– Experimentos com Estimulação Elétrica Indireta**

Os ratos foram anestesiados por inalação de éter etílico e exangüinados imediatamente após a anestesia. Os corações eram removidos rapidamente após toracotomia e perfundidos com solução de Ringer através do coto aórtico para permitir a adequada seleção e dissecação dos átrios. As preparações foram montadas em uma cuba com volume de 15 ml, e continuamente superfundidas com solução de Ringer, composta por (em mM): 110 NaCl; 4,0 KCl; 2,0  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 2,0  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 10,0 Trisma; 11,0 Glicose; pH 7,4. Para evitar a possibilidade de hipóxia, os experimentos foram realizados sob baixa temperatura ( $29 \pm 1^\circ C$ ) como previamente descrito (Vassallo et al.; 1994) e, continuamente gaseificada com oxigênio ( $O_2$ ). Os átrios eram estirados até um comprimento máximo  $L_{max}$  (comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima) e estimulados por meio de pulsos retangulares (10 a 15 V; 12 milisegundos de duração) através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo. A frequência de estimulação padrão foi de 0,5 Hz (condição-constante). As preparações eram mantidas por um período de estabilização de 60 minutos para permitir sua adaptação às novas condições ambientais e, em seguida, eram iniciados os protocolos experimentais. A força desenvolvida (F) ou a Tensão Basal eram avaliadas através do uso de um transdutor de força (Scientific Instruments,

GMBH, Heidelberg, Alemanha) e, após sua calibração, registrados em polígrafo (Beckman 5525; Type RM Dynograph® Recorder).

### **2.1.1– Efeitos do eugenol sobre a força da contração isométrica do músculo atrial: Curva Dose-Resposta**

Para se avaliar um possível efeito do eugenol sobre a força da contração isométrica (F) e/ou Tensão Basal do músculo atrial, foi elaborado o seguinte protocolo: Após período de estabilização de 60 minutos e a preparação mantida sob estimulação padrão, eram adicionadas à solução banho concentrações cumulativas de eugenol (1; 3; 5; 7 e 10 mM) observando-se um intervalo de tempo de 15 minutos entre cada concentração. Este período foi suficiente para que a força (tensão basal) alcançasse o estado estacionário.

### **2.1.2– Efeitos do eugenol sobre a mobilização do cálcio intracelular e extracelular.**

Para avaliarmos os possíveis efeitos do eugenol sobre a mobilização tanto do cálcio intracelular como do cálcio extracelular, foram elaborados dois protocolos:

**a)** Para avaliar o efeito do eugenol sobre a contração induzida pela liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático, as preparações sob estimulação padrão, eram incubadas durante 10 minutos com procaína (10 mM), um conhecido bloqueador não específico de RyRs. Decorrido esse tempo, era adicionado eugenol (5 mM) à preparação e observado seu efeito durante os próximos 40 minutos.

**b)** Objetivando a confirmação de que a procaína inibia completamente a liberação de cálcio pelos RyRs, bem como o não envolvimento do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, desenvolvemos um protocolo utilizando solução de Ringer Zero- $\text{Ca}^{2+}$ , com a seguinte composição (em mM): 112 NaCl; 4,0 KCl; 2,0  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 10,0 Trisma; 11,0 Glicose; pH 7,4 ajustado com KOH.

Após período de estabilização da preparação em solução Ringer Normal e mantida continuamente sob estimulação padrão, esta solução era substituída por solução Ringer Zero- $\text{Ca}^{2+}$ . Após estabilização, era adicionada Procaína (10 mM). Era

aguardado um novo período para estabilização e, logo após, era adicionado eugenol (5mM).

### **2.1.3– Efeitos do eugenol sobre os receptores $IP_3$**

Objetivando avaliar uma possível ação do eugenol sobre receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ou, mais especificamente, sobre os  $IP_3$ Rs, foi elaborado o seguinte protocolo: Após período de estabilização, a preparação continuamente mantida sob estimulação padrão, era incubada por 30 minutos com 100  $\mu$ M de 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borato), um bloqueador não específico de  $IP_3$ Rs. Após este período de incubação, era repetido o protocolo dose-resposta ao eugenol (1, 3, 5, 7 e 10 mM).

### **2.1.4– Efeito Tempo-Dependente do 2-APB**

Para nos certificarmos de que os efeitos 2-APB não eram tempo-dependentes, foi realizado o seguinte protocolo:

Após período de estabilização da preparação em solução de Ringer-Normal e, continuamente sob estimulação padrão, foi adicionado à preparação 2-APB (100  $\mu$ M). Completado o período de tempo do experimento conforme protocolo anterior, a preparação era lavada por 3 vezes e a solução tratada era substituída pela solução de Ringer-Normal. Ao final de 40 minutos, era realizada a avaliação da viabilidade da preparação.

### **2.1.5- Efeitos do eugenol sobre receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos: A via dos $IP_3$ Rs**

Objetivando evidenciar uma provável via de ação do eugenol, foi elaborado o seguinte protocolo:

Após período de estabilização, preparações mantidas continuamente sob estimulação-padrão foram tratadas com fenilefrina (PHE) (10  $\mu$ M). Logo em seguida, atingida a estabilização, 100  $\mu$ M de 2-APB era adicionado ao banho e aguardado tempo para que a preparação se adaptasse às novas condições experimentais. Ao final desse tempo, eugenol (5 mM) era adicionado à preparação.

Em outro grupo experimental e, para termos certeza que não houve influencia da Fenilefrina sobre a ação do Eugenol, ou vice versa, repetimos o mesmo protocolo, porem na ausência do bloqueador não especifico dos IP<sub>3</sub>Rs, o 2-APB. A preparação foi mantida em estimulação condição-padrão até sua estabilização, sendo então adicionada fenilefrina (10 µM) à solução banho. Uma vez atingido o estado estacionário, era adicionado Eugenol (5 mM) à solução banho.

### **2.1.6 – Efeitos do eugenol sobre os receptores de rianodina e os receptores IP<sub>3</sub>**

Objetivando verificar se o eugenol poderia ou não estar atuando via RyRs ou IP<sub>3</sub>Rs, desenvolvemos dois outros protocolos experimentais:

a) Após sua preparação, e mantidos sob estimulação constante, os músculos atriais eram tratados com rianodina (100 µM), um bloqueador específico para os RyRs. Após um período de tempo de 20 minutos para a devida adequação as novas condições experimentais, eugenol (5 mM) era adicionado ao banho.

b) Em uma outra preparação, e mantidos sob estimulação constante, os músculos atriais eram tratados com rianodina (100 µM) e 2-APB (100 µM), um bloqueador não específico para IP<sub>3</sub>Rs. Após um período de tempo de 20 minutos para a devida adequação às novas condições experimentais, eugenol (5 mM) era adicionado ao banho.

### **2.2– Experimentos Com Fibras Atriais Permeabilizadas (*Skinned Fiber*)**

Para avaliarmos os possíveis efeitos do eugenol sobre o aparelho contrátil muscular; sobre o retículo sarcoplasmático, bem como sobre a seqüência de reações químicas que levam à fosforilação e ativação das proteínas contráteis musculares, realizamos experimentos com a técnica de fibra desmembranada (*skinned fiber*). Esta preparação tem-se mostrado especialmente útil pelo fato de se poder manter sob estrito controle a composição da solução que irá banhar as organelas intracelulares e o sistema contrátil. Com a utilização da solução permeabilizante contendo saponina, 30 µg/ml (Sigma Chemical), um glicosídeo que atua interagindo com moléculas de colesterol presentes na bicamada lipídica do sarcolema e no sistema tubular transverso, ocasionando remoção seletiva desse lipídio de cadeia planar e promovendo perfurações na membrana (Launikonis e



Stephenson, 1997). Essas estruturas são seletivamente permeabilizadas preservando, além das proteínas do sistema contrátil, o RS e suas estruturas de membrana. Através deste método serão obtidos os dados referentes ao comportamento do cálcio através da membrana permeabilizada desta organela. Para o estudo dos efeitos do eugenol sobre a cinética do cálcio exclusivamente sobre o aparato contrátil actina-miosina, será utilizada solução permeabilizante purificada contendo Triton X-100 (Boeringer) 1% vol/vol. O Triton X-100 é um detergente não iônico com a capacidade de solubilizar estruturas lipídicas, como o sarcolema e as membranas de todas as organelas intracelulares, permanecendo intacto e preservado no meio intracelular, apenas o aparelho contrátil (Godt et al.; 1991; Lamb et al.; 1994)..

### **2.2.1 – Experimentos com trabéculas de músculo atrial desmembranadas através do uso de Saponina e/ou Triton X-100**

#### **a) Metodologia para as preparações**

Os músculos atriais foram preparados conforme descrito anteriormente (no item 3.2.1). Uma vez dissecados, os átrios eram transferidos para uma placa de *Petri* contendo a Solução R (**Tabela 1**). Esta solução tem a propriedade de quelar o cálcio, induzindo ao relaxamento total das fibras e, permitir a realização da dissecação das trabéculas sem risco de laceração de tecido. Em seguida, as trabéculas eram transferidas e mantidas, por 20 minutos, em uma câmara contendo a mesma Solução R acrescida de saponina (30 µg/mL) ou, por 10 minutos, para a Solução R acrescida com 1% (v/v) de Triton X-100, um detergente não iônico. Após a permeabilização por saponina ou por Triton X-100, as trabéculas eram transferidas para outra câmara contendo Solução R e aí mantidas até o início dos experimentos.

#### **b) Soluções**

Para se realizar o cálculo da composição das soluções foi empregado o programa de computador em linguagem turbo que descreve as múltiplas constantes

de equilíbrio de íons em solução usando valores constantes de associação previamente publicados (Godt & Lindley, 1982; Andrews et al.; 1991). As composições das soluções são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1-** Composição das soluções usadas nos experimentos com fibras permeabilizadas por Saponina e por Triton X-100.

	Solução R	Solução L	Solução E	Solução A
Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	1	1	1	0,1
MgATP (mmol/L)	1	1	1	1
NaCP (mmol/L)	15	15	15	15
EGTA (mmol/L)	5	5	0,5	5
BES	50	50	50	50
pCa (-log[Ca <sup>2+</sup> ])	>8,5	6,4	>8,5	4,0
pH	7	7	7	7
Força iônica	200	200	200	200
Temperatura (°C)	22	22	22	22

Nota: NaCP, Na<sub>2</sub>phosphocreatine; BES, N,N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; pCa = -log[Ca<sup>2+</sup>]<sub>0</sub>; e pH = -log [H<sup>+</sup>].

As soluções descritas na tabela 1 tem concentrações de 0,5 mM e 5 mM de EGTA (ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) que é um agente com capacidade de quelar íons Ca<sup>2+</sup> da solução (Godt & Lindley, 1982; Andrews et al.; 1991).

A solução R (pCa 8,5) (pCa = -log[Ca<sup>2+</sup>]) é denominada de solução relaxante por apresentar uma concentração de íons Ca<sup>2+</sup> inferior a 10<sup>-8,5</sup> M e alta concentração de EGTA, o que permite quelar todo o Ca<sup>2+</sup> que ainda possa estar na solução banho. É descrito na literatura que a cafeína, um conhecido agonista de RyRs, na concentração de 30 mM, é capaz de induzir a liberação total dos estoques de Ca<sup>2+</sup> do RS (Endo, 1975).

A Solução A (pCa 4.0) possui concentração de íons Ca<sup>2+</sup> suficiente para a ativação máxima do aparato contrátil fornecendo, conseqüentemente a máxima capacidade de desenvolvimento de força pela trabécula. Para efeito de

quantificação, a força desenvolvida pela trabécula quando em pCa 4,0 foi determinada como padrão “gold”.

A solução L (pCa 6,4) apresenta uma concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  suficiente para induzir, por transporte ativo, um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS. Dessa forma, podemos afirmar que a solução L apresenta a propriedade de recarregar com íons  $\text{Ca}^{2+}$  o RS. Portanto, essa solução nos permite, num mesmo experimento, submetermos as mesmas trabéculas a soluções diferentes, com agentes diferentes, possibilitando assim, uma análise comparativa direta entre os vários tratamentos.

A solução E (pCa 8,5) apresenta uma concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  inferior a  $10^{-8}\text{M}$ . Como a concentração de EGTA é baixa (0,5 mM), sua capacidade de tamponamento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  é pequena. Portanto quando a liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS é efetuada, este íon (por não ser tamponado) ativará o sistema contrátil, o qual desenvolverá tensão, e esta fornecerá um indicativo da quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado do RS. Possibilitando ainda que agentes indutores da liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do RS possam ser adicionados a ela, sem que tenham sua ação alterada tanto em relação a liberação destes íons como em relação à ação destes íons sobre o aparato contrátil.

### **c) Medidas de força**

As extremidades das trabéculas de músculo atrial, isoladas e permeabilizadas, foram montadas entre 2 fórcepes, sendo uma extremidade conectada a um transdutor de força isométrica (Scientific Instruments, GMHB, Heidelberg, Alemanha) e, a outra extremidade conectada a um micromanipulador. Os registros gráficos serão realizados usando-se um polígrafo modelo RB 1020; Equipamentos Científicos do Brasil. As trabéculas foram estiradas até 20% do comprimento do músculo na condição de relaxamento. As soluções experimentais foram adicionadas a cada uma de uma série de câmaras denominadas de “troff” com capacidade de 2,5 ml. Tais câmaras foram encaixadas numa base acrílica e mantidas sob constante agitação mediante barras de aço inoxidável imantadas. As trabéculas foram transferidas a diferentes câmaras e expostas a diferentes soluções.

### **2.2.2– Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC em fibras atriais permeabilizadas por saponina**

Para testarmos os efeitos do eugenol sobre os estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  bem como, sobre o aparato contrátil, desenvolvemos o seguinte protocolo: Após serem montadas entre um transdutor de força e um braço móvel, as trabéculas serão estiradas 20% em relação ao seu tamanho na condição de relaxamento, e mantidas, por poucos minutos, em solução R.

A partir da solução R, as trabéculas serão transferidas para a solução A, onde permanecerão tempo suficiente para a obtenção da máxima tensão basal induzida pela alta concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na solução. Tal tempo será o adequado para ativar todo o aparato contrátil. Tal procedimento nos fornecerá valores relacionados ao desenvolvimento da maior tensão basal possível para esta trabécula.

Após a contração, as trabéculas foram novamente transferidas para Solução R relaxante e mantidas nesta por alguns minutos. Esses minutos constituirão tempo suficiente para o relaxamento total da preparação em decorrência da ação do EGTA.

Em seguida, a trabécula foi transferida, por um período de 2 minutos, para Solução L. Isto possibilita que o RS seja recarregado com íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Dados de nosso laboratório indicam que esse tempo é suficiente para a obtenção da capacidade máxima de carregamento do RS (dados não mostrados).

Em seguida, as trabéculas foram transferidas e mantidas, por 30 segundos, em Solução E, a qual apresenta uma baixa concentração de EGTA. Da solução E, a preparação foi transferida para outra câmara contendo Solução E acrescida de Cafeína (30 mM). A preparação foi mantida nesta condição pelo tempo suficiente para ativação do aparato contrátil e produção de tensão basal em decorrência dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  liberados pela ação agonista da Cafeína.

Em seguida, a preparação foi transferida para a Solução R, a fim de que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  liberados por ação da Cafeína sejam quelados e, conseqüentemente, ocorra o relaxamento muscular. Uma vez atingido o estado de relaxamento, a preparação foi transferida para a Solução L a fim de que o RS seja recarregado com íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Após o carregamento, a preparação foi transferida para Solução E, a qual é responsável por quelar os íons  $\text{Ca}^{2+}$  do meio citosólico. Logo após, a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E acrescida de Eugenol (5 mM).. A preparação foi mantida nesta câmara até que a tensão basal atinja um platô de estabilização.

### **2.2.3 – Efeitos do 2-APB sobre a ação do eugenol no processo de AEC em fibras permeabilizadas por saponina**

Objetivando avaliar se a ação do Eugenol sobre o processo de AEC estaria envolvendo a via dos IP<sub>3</sub>Rs, elaboramos um novo protocolo experimental. As trabéculas atriais foram preparadas e montadas conforme o descrito anteriormente (no item 2.2.2.), porém, ao final, a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E acrescida de 2-APB (100 µM) e mantida nestas condições por 15 minutos (período de incubação). Após estes período a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E acrescida de Eugenol (5 mM) e 2-APB (100 µM) A preparação foi mantida nestas condições ate que a tensão basal atinja um platô de estabilização.

### **2.2.4 – Efeitos da Heparina sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina**

Objetivando, mais uma vez, avaliar se a ação do Eugenol sobre o processo de AEC estaria envolvendo a via dos IP<sub>3</sub>Rs, elaboramos um novo protocolo experimental utilizando, desta feita, a heparina, um bloqueador específico de IP<sub>3</sub>R (Maruyama, T. et al., 1997; Bootman, M. D. et al., 2002).

As trabéculas atriais foram preparadas e montadas conforme o descrito anteriormente (no item 2.2.2.), porém, ao final, a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E acrescida de heparina (5 mg/ml). Após 15 minutos de incubação, a preparação, era transferida para uma nova câmara contendo Solução E contendo heparina (5 mg/ml) mais eugenol. A preparação foi mantida nestas condições ate que a tensão basal atingisse um platô de estabilização.

### **2.2.5 – Efeitos do Ruthenium Red (RR) sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina**

Para nos certificarmos de que a ação do eugenol no processo de AEC não esteja envolvendo a via dos RyRs desenvolvemos um outro protocolo no qual a preparação, foi submetida a um tratamento com ruthenium red (10 µM). O Ruthenium Red (Ammoniated Ruthenium Oxycloride) é um agente bem descrito na

literatura e utilizado como inibidor mitocondrial do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Gunter, 1990) bem como um inibidor não específico de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS de músculo liso, músculo estriado e cardíaco (Vites e Pappano, 1994; Chamberlain et al., 1984). As trabéculas atriais foram preparadas e montadas conforme o descrito anteriormente (no item 2.2.2.), só que desta feita, após passarem pelos troff contendo solução A e pelo “troff” contendo solução R, as trabéculas foram transferidas, e incubadas por 20 minutos, para o “troff” contendo Solução E acrescida de Ruthenium Red (10  $\mu\text{M}$ )

Logo após, a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E contendo ruthenium red (10  $\mu\text{M}$ ) e acrescida de Eugenol (5 mM). A preparação foi mantida nestas condições até que a tensão basal atingisse um platô de estabilização.

#### **2.2.6 – Efeitos da Heparina e da Procaína sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina**

Objetivando avaliar, de uma melhor forma, a(s) via(s) de ação do eugenol bem como um melhor entendimento dos efeitos induzidos pelo ruthenium red, elaboramos outro protocolo no qual utilizaremos a procaína e a heparina, bloqueadores específicos para os RyRs e  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , respectivamente. As trabéculas atriais foram preparadas e montadas conforme o descrito anteriormente (no item 2.2.2.), porém, ao final, a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E acrescida de Heparina (5 mg/ml) e Procaína (10 mM), e mantidas nestas condições experimentais por 15 minutos. Após este período a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E acrescida de Eugenol (5 mM), Heparina (5 mg/ml) e Procaína (10 mM). A preparação foi mantida nestas condições até que a tensão basal atingisse um platô de estabilização.

#### **2.2.7 – Efeitos do BDM sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina**

Para determinarmos se a elevação da tensão basal induzida pelo eugenol não era um estado de *rigor mortis*, elaboramos um protocolo no qual utilizamos o BDM (monóxido de 2,3 butanediona) um bem descrito bloqueador do ciclo das pontes

transversas (Li et al, 1984; Stephenson & West, 1989; Higuchi & Takemori, 1989; Herrmann et al, 1992). As trabéculas atriais foram preparadas e montadas conforme o descrito anteriormente (no item 2.2.2.). Assim foram mantidas, por poucos minutos, em Solução R. Em seguida, a preparação foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E e Eugenol (5 mM). A preparação foi mantida nestas condições até que a elevação da tensão basal induzida pela ação do eugenol atingisse um platô de estabilização.

Uma vez atingida a estabilização, a preparação foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E mais Eugenol (5 mM) e BDM (10 mM). A preparação foi mantida nessas condições até que fosse atingida a estabilização.

Posteriormente, o mesmo protocolo foi repetido, porém, na presença de BDM (30 mM).

### **2.3 – Átrios permeabilizados por Triton X-100**

O Triton X-100 é um detergente não iônico com capacidade de solubilizar estruturas lipídicas tanto de membrana plasmática quanto de membrana de organelas intracelulares. Após a ação permeabilizante do Triton X-100, continuam intactas e funcionais apenas as estruturas protéicas, dentre elas, todo o aparato contrátil. Dados de nosso laboratório indicam que o tempo de 10 minutos de exposição à solução com Triton X-100 (1% - vol/vol) é suficiente para solubilizar tanto as membranas lipídicas citosólica quanto as organelas.

#### **2.3.1 – Efeitos do eugenol no processo de AEC em fibras atriais permeabilizadas por Triton X-100 (1% - vol/vol)**

Para testarmos uma possível ação do eugenol sobre os miofilamentos contráteis, elaboramos protocolos nos quais as trabéculas atriais eram tratadas com o detergente não iônico, Triton X-100. Para testarmos a ação do Triton X-100 repetimos o protocolo que quantificou a ação do eugenol no processo de AEC em fibras permeabilizadas por saponina. Assim, inicialmente as trabéculas eram permeabilizadas por saponina conforme descrito anteriormente (no item 2.2.1 sub-item “a”). As trabéculas atriais foram preparadas e montadas conforme o descrito anteriormente (no item 2.2.2.). Logo após, a preparação foi transferida para uma nova câmara contendo Solução E acrescida de Eugenol (5 mM). A preparação era

mantida nestas condições até que a elevação da tensão basal induzida pelo eugenol atingisse um platô de estabilização.

Uma vez atingida a tal estabilização, a preparação foi transferida diretamente para outra câmara contendo a mesma Solução E mais Triton X-100 (1% - vol/vol) e eugenol (5 mM), a preparação foi aí mantida até que se atingisse um platô de estabilização.

### **2.3.2 – Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC antes e depois das fibras atriais serem permeabilizadas com Triton X-100**

Para determinarmos se durante a permeabilização por Triton X-100 (1% - vol/vol) não exista a possibilidade de deterioração do aparato contrátil ou qualquer comprometimento do ciclo das pontes cruzadas elaboramos o seguinte protocolo.

Após terem sido dissecadas, as trabéculas atriais foram submetidas, por 20 minutos, ao processo de permeabilização por saponina conforme descrito anteriormente. Após permeabilizadas por ação da saponina, as trabéculas foram montadas conforme descrito anteriormente. Uma vez montadas, as trabéculas foram transferidas, por 2 minutos, para uma câmara contendo Solução R. Logo em seguida, as trabéculas foram transferidas para uma outra câmara contendo Solução A. Logo após, as trabéculas foram transferidas para a câmara contendo a solução R. Em seguida, as trabéculas foram transferidas para uma outra câmara contendo solução R mais Cafeína (30 mM). Pelo fato da solução R apresentar uma alta concentração de EGTA, era de se esperar que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  liberados fossem imediatamente quelados e, conseqüentemente, não teríamos a resposta contrátil das trabéculas. Logo em seguida, a preparação foi transferida, por alguns minutos, para uma câmara contendo solução R e daí, transferida para outra câmara contendo solução R mais Eugenol (5 mM). Os dados assim obtidos, nos permitiam determinar a ação do eugenol num ambiente com alta concentração de EGTA. Logo em seguida, as trabéculas foram transferidas, por 10 minutos, para outra câmara contendo solução R e Triton X-100 (1% - vol/vol). Após a permeabilização por triton X-100, a preparação foi transferida, para lavagem, para uma outra câmara contendo solução R. Logo após, a preparação foi novamente transferida para a câmara contendo solução R mais Cafeína (30 mM). Uma nova lavagem era realizada em outra câmara contendo solução R. Em seguida, as trabéculas foram transferidas



para a câmara que contendo solução R mais Eugenol (5 mM). Uma vez atingida a estabilização, as trabéculas foram novamente transferidas, para lavagem, para a câmara contendo solução R. Ao final da lavagem, as trabéculas foram, finalmente, transferidas para a câmara contendo solução A, e, aí mantidas até que fosse atingido um platô de estabilização.

### **3 – Drogas**

Todos os sais e substâncias utilizados neste trabalho eram de pureza analítica (pureza do eugenol = 99%) e adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo; U.S.A.); Merck (Darmstadt, Alemanha) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Heparina em forma policatiônica será adquirida do Laboratório Roche (São Paulo, SP, Brasil), e o 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo; U.S.A.).

### **4 – Análise Estatística**

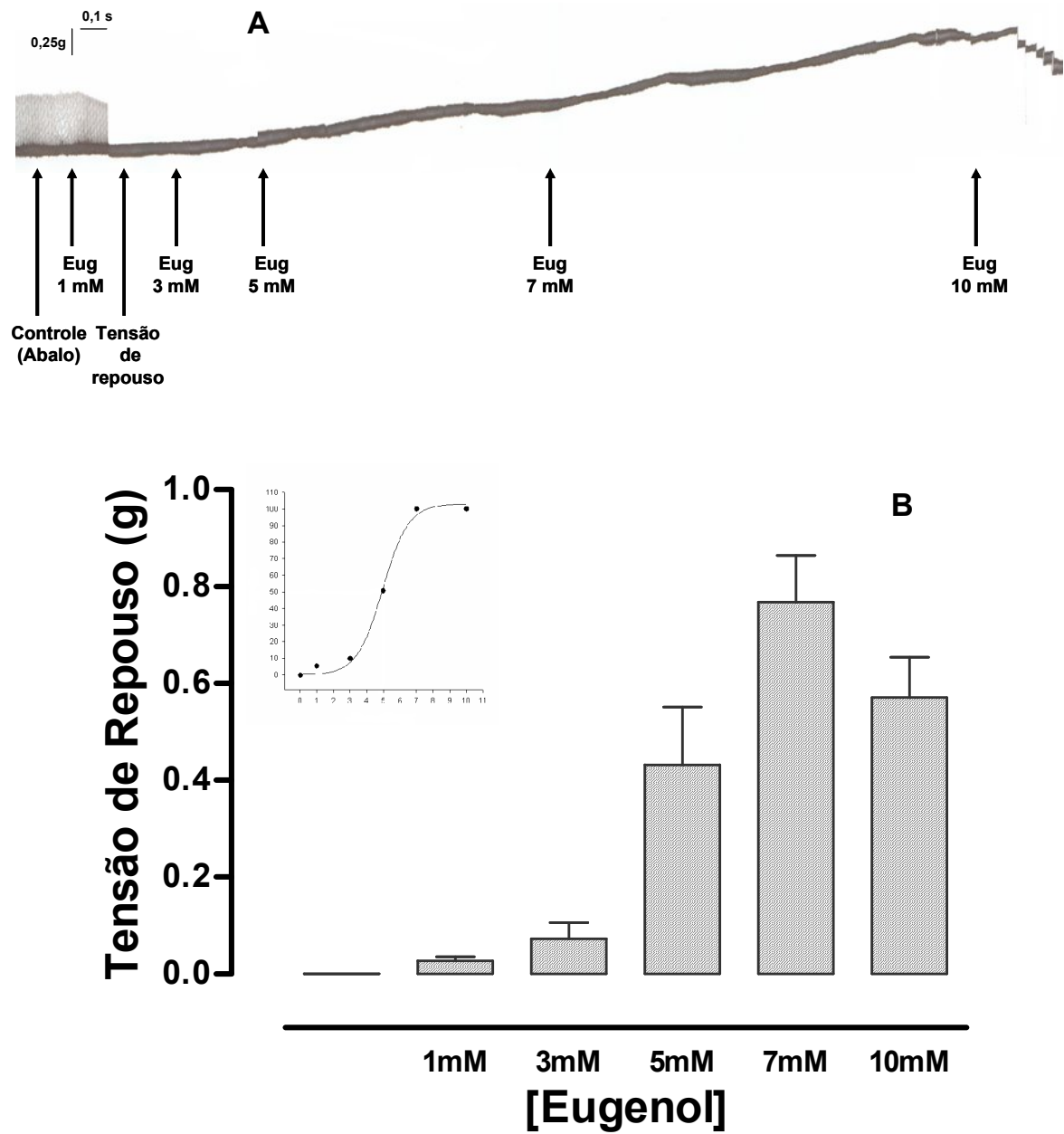
Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 6 observações (n). Para a análise estatística utilizamos o teste t de Student e/ou ANOVA (uma ou duas vias). Quando ANOVA revelou uma diferença significativa o teste de Tukey foi aplicado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas, quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula foi  $\leq 0,05$ . Valores de \*  $p < 0,05$  e de #  $p < 0,01$  foram considerados significativos. A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando-se os softwares GraphPad Prism System (San Diego, CA, U.S.A.) e/ou SigmaPlot e SigmaStat.

## RESULTADOS

### 1 – EXPERIMENTOS COM ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA INDIRETA: MÚSCULO INTACTO

#### 1.1- Efeitos do eugenol sobre o processo AEC: Curva Dose-Resposta

Os registros típicos mostram os efeitos do eugenol, em diferentes concentrações (1; 3; 5; 7 e 10 mM) sobre a força da contração isométrica e/ou tensão de repouso desenvolvida pelos músculos atriais. Os resultados demonstram que o eugenol foi capaz de abolir o abalo muscular, todavia, a tensão de repouso mostrou uma elevação, concentração-dependente, sugerindo o desenvolvimento de força pelos músculos atriais (**Figura 16 A**). O gráfico da **Figura 1 B** mostra que o eugenol, em altas concentrações (1 – 7 mM), foi capaz de induzir uma elevação da tensão de repouso indicando, portanto, desenvolvimento contração com  $E_{\max} = 0,768 \pm 0,096$  (g);  $n = 6$ . Todavia, em concentrações maiores (10 mM) ocorria uma estabilização ou até mesmo um pequeno decréscimo na força desenvolvida;  $0,577 \pm 0,086$  (g);  $N = 6$ . O EC50 observado é de  $\sim 4,781$  (mM) (**Figura 16 B** inserido).

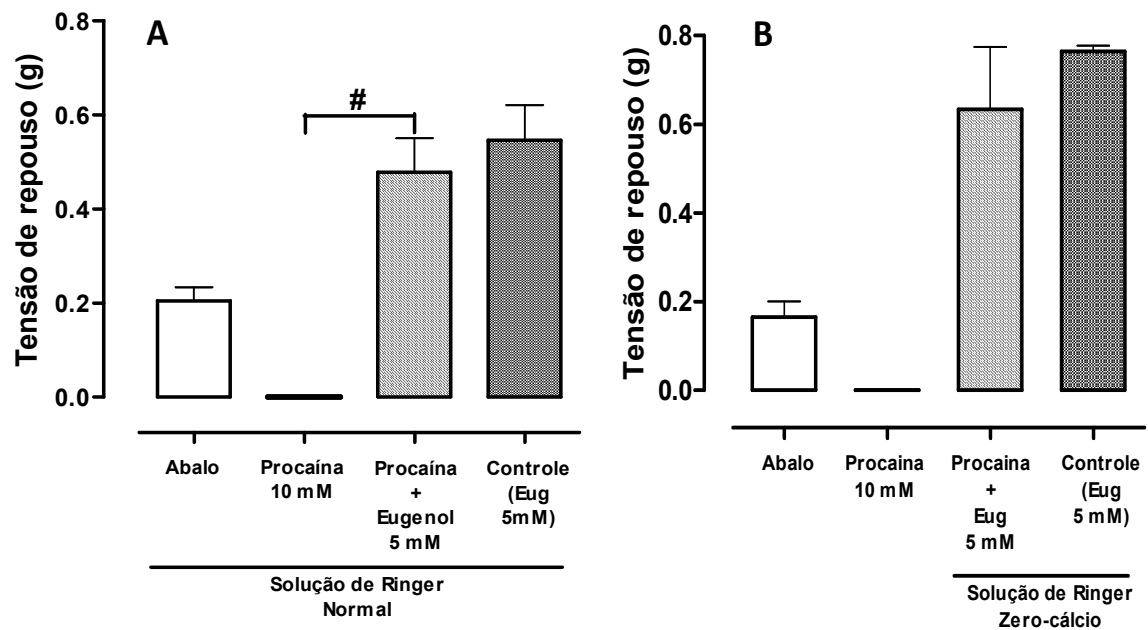


**Figura 16-** Efeitos do eugenol sobre a contração e da tensão de repouso, em condições isométricas, de músculos atriais de ratos: **(A)** Registro típico de experimento mostrando os efeitos do eugenol em diferentes concentrações (1; 3; 5; 7 and 10 mM). **(B)** Curva Dose-Resposta ao eugenol (1 – 10 mM) sobre a tensão de repouso de músculo atrial de rato. O destaque mostra o “best fit” da curva.

## 1.2 - Efeitos do eugenol sobre a mobilização do cálcio intracelular e extracelular.

A “liberação de cálcio induzida por cálcio” (CICR) representa um importante estagio no processo de AEC. Esse evento provê a quantidade adequada de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático para ativar as proteínas contráteis e a resultante contração do músculo cardíaco. Tal mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre, principalmente, via RyRs (Franzini-Armstrong, 1970; Bers & Stiffel, 1993). A **Figura 17 A** mostra que a procaína (10 mM), um conhecido bloqueador não específico de RyRs, foi capaz de abolir completamente o abalo muscular. Todavia, quando eugenol (5 mM) era adicionado ao banho (solução de Ringer-Normal), este composto foi capaz de elevar a tensão de repouso até  $0,478 \pm 0,072$  (g); N = 8.

O controle da contratilidade cardíaca pode ser modulada por meio de alterações na concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (Yue et al.; 1986). A **Figura 17 B** mostra que quando o músculo atrial estava em banho de solução de Ringer Zero- $\text{Ca}^{2+}$  acrescida de procaína (10 mM) o abalo ( $0,165 \pm 0,036$  g) foi abolido completamente. Entretanto, quando eugenol (5 mM) foi adicionado à solução banho (Ringer zero-cálcio), este composto foi capaz de induzir uma elevação da tensão de repouso para até  $0,633 \pm 0,141$  (g); N = 6.



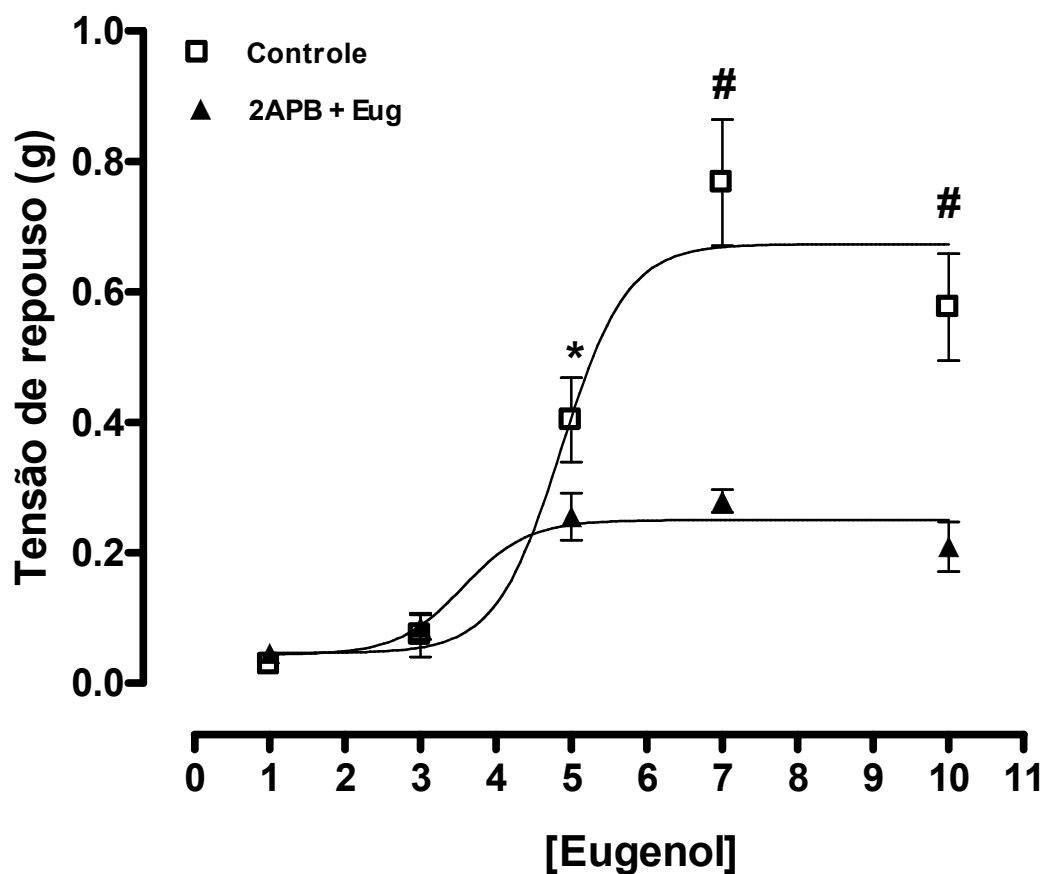
**Figura 17** – Efeitos do eugenol (5 mM) na ausência e na presença de procaína (10 mM) sobre a tensão de repouso desenvolvida pelos músculos atriais de ratos em preparações mantidas em Solução de Ringer Normal **(A)** e Solução de Ringer Zero-cálcio **(B)**. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM; Teste t de Student; #  $p < 0,01$ ; N = 8.

### 1.3 - Efeitos do eugenol sobre receptores IP<sub>3</sub>

É bem relatado na literatura que o tipo 2 de IP<sub>3</sub>R é bem expresso no músculo atrial e, assim, poderíamos supor que ele poderia estar envolvido nos efeitos do eugenol. Assim sendo, desenvolvemos um protocolo em que esses receptores eram inibidos. Para esse propósito, repetimos o protocolo de curva dose-resposta ao eugenol na ausência e na presença de 2-APB, um bloqueador não específico dos receptores IP<sub>3</sub> (Peppiatt et al., 2003). A **Figura 18**, mostra os efeitos do eugenol em diferentes concentrações (1; 3; 5; 7 e 10 mM) sobre a tensão de repouso do músculo atrial. Já na primeira concentração de eugenol (1 mM) que foi utilizada, observamos que a contração isométrica desenvolvida pelos músculos atriais foi completamente inibida (**Figura 16 A**). Além disso, os resultados também mostram uma elevação concentração-dependente da tensão de repouso induzida pelo eugenol. Todavia, quando a preparação recebia um pré-tratamento com 2-APB (100 µM) o eugenol induzia uma significativa menor elevação da tensão de repouso (desvio para a direita), também de forma concentração-dependente, do músculo atrial (**Figura 18 e Tabela 2**).

	Controle (g)	N	2-APB (g)	N
<b>1 mM</b>	0,028 ± 0,008	7	0,045 ± 0,011	7
<b>3 mM</b>	0,073 ± 0,033	7	0,085 ± 0,018	7
<b>5 mM</b>	0,403 ± 0,064	7	0,255 ± 0,036	7 *
<b>7 mM</b>	0,767 ± 0,096	7	0,279 ± 0,017	7 #
<b>10 mM</b>	0,576 ± 0,081	7	0,209 ± 0,038	7 #

**Tabela 2-** Efeitos do eugenol em diferentes concentrações, na presença e na ausência de 2-APB (100 µM) sobre a tensão de repouso de músculo atrial de ratos. Os resultados são apresentados como média ± EPM; \* p<0,05; # p<0,01; Teste t de Student.

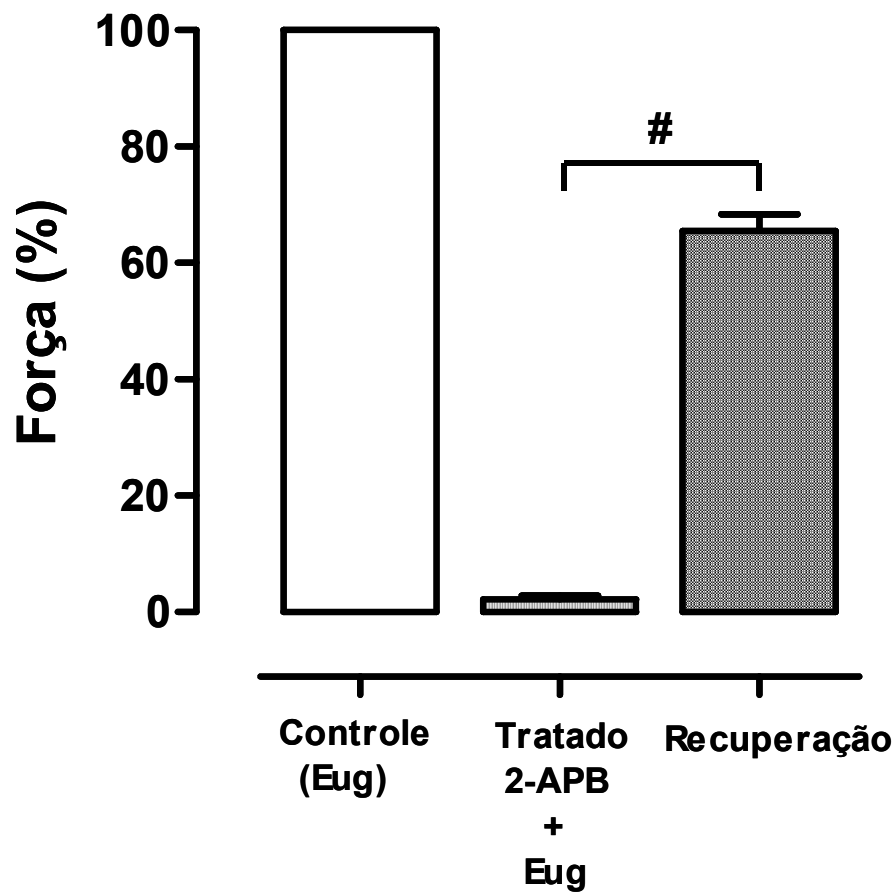


**Figura 18-** Curva dose-resposta dos efeitos do eugenol (1 – 10 mM) sobre a tensão de repouso do músculo atrial na ausência e na presença de 2-APB (100  $\mu$ M). Cada ponto do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de 7 experimentos. #  $p < 0,01$  e \*  $p < 0.05$ ; ANOVA (*one way*) seguida pelo teste de Tukey; 2-APB + Eugenol vs Controle.

#### 1.4 - Efeito Tempo-Dependente do 2-APB

De alguma forma, o tratamento com 2-APB e eugenol, devido ao seu longo curso temporal, poderia estar induzindo algum tipo de injúria à preparação muscular atrial. A **Figura 19** mostra que após a remoção do eugenol e 2-APB, o abalo do músculo atrial foi recuperado em  $65,513 \pm 2,870$ ; (%); N = 6. Esses resultados sugerem que nem 2-APB (100  $\mu$ M) e nem Eugenol (5 mM), foram capazes de induzir efeitos lesivos e/ou irreversíveis à preparação.



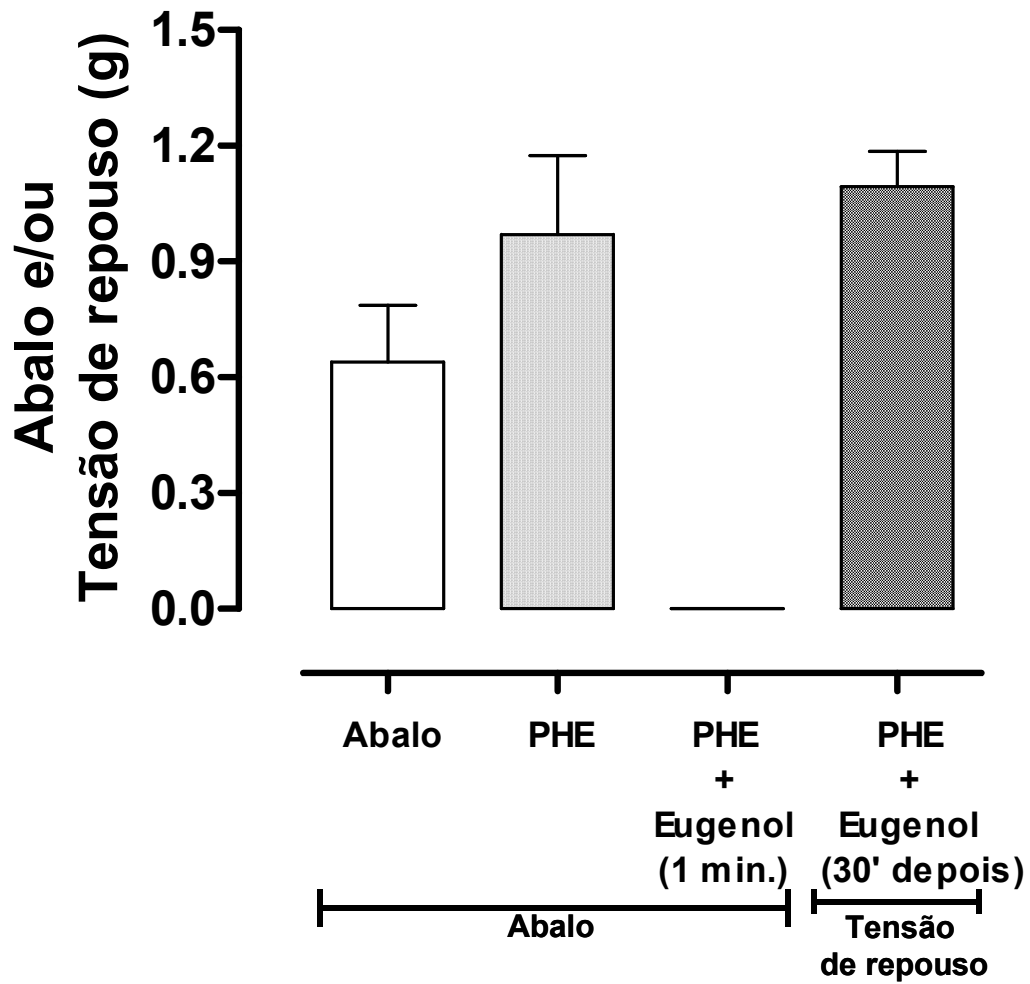


**Figura 19** – Ao final do experimento com tratamento com 2-APB (100  $\mu$ M) e eugenol (5 mM), os músculos atriais eram lavados por 3 vezes com solução Ringer Normal e, após 40 minutos a recuperação da força da contração isométrica era reavaliada. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; #  $p < 0,01$ ; Teste t de Student;  $n = 7$ ; Recuperação vs Controle.

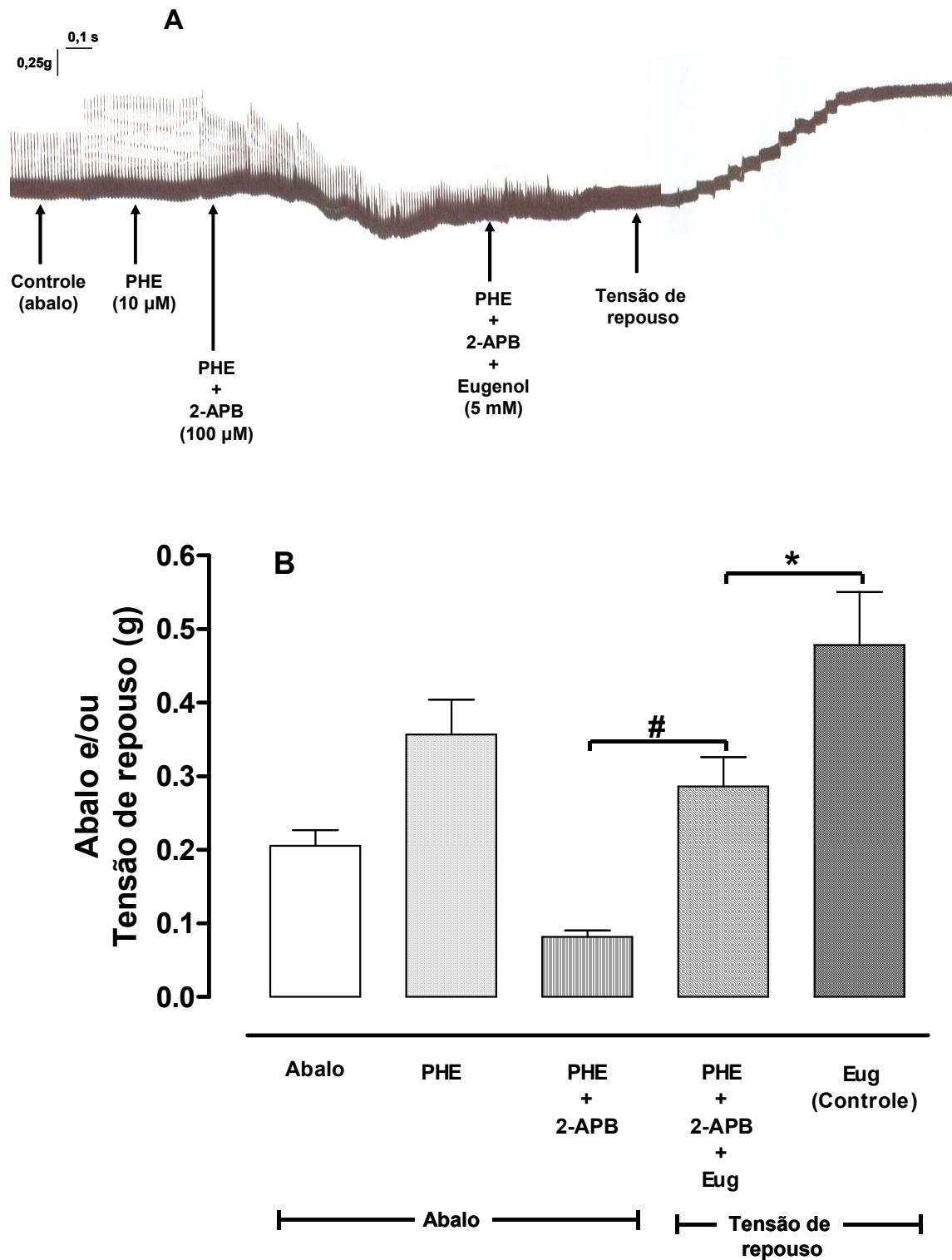
### 1.5- Efeitos do eugenol sobre os receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos: A via $IP_3R$

A estimulação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos desempenha um importante papel na regulação da contração cardíaca (Li et al., 1997; Wang et al., 2005). Em geral, a estimulação  $\alpha_1$ -AR leva a produção de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) e, no músculo cardíaco, o  $IP_3$  aumenta a liberação intracelular de  $Ca^{2+}$  via  $IP_3Rs$  (Nosek et al.; 1986; Wang et al.; 2005). Fenilefrina (PHE), um agonista  $\alpha_1$ -AR, exerce um efeito inotrópico positivo no músculo atrial de ratos (Jahnel et al.; 1992; Wang et al.; 2005). Assim, objetivando verificar uma possível ação do eugenol via  $IP_3Rs$  o músculo atrial foi tratado com PHE (10  $\mu M$ ) e, após período de estabilização, eugenol (5 mM) foi adicionado à solução banho. Em todos os experimentos a PHE induziu um aumento na força de contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial. Todavia, quando o eugenol era adicionado à preparação, este composto aboliu completamente as contrações isométricas atriais. Entretanto, após 30 minutos, a tensão de repouso da preparação era significativamente elevada para  $1,094 \pm 0,091$  (g). Tais resultados indicam que o eugenol (5 mM), era capaz de elevar a tensão de repouso ou seja, produzir contração (**Figura 20**).

Em um outro protocolo, e objetivando melhor elucidar a via ou as vias de ação do eugenol, utilizamos a fenilefrina (PHE) e o 2-APB. Quando a PHE (10  $\mu M$ ) era adicionada à solução banho, a contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial era aumentada de  $0,216 \pm 0,021$  (g) para  $0,357 \pm 0,047$  (g); N= 9. Quando o 2-APB (100  $\mu M$ ) era adicionado a esta mesma solução banho, a contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial era grandemente reduzida para  $0,085 \pm 0,009$  (g); N= 9 (**Figura 21 A e B**). Entretanto, quando o eugenol era adicionado a esta solução ele abolia completamente o abalo muscular porém, após 30 minutos de incubação com o eugenol (5 mM) a tensão de repouso era elevada para  $0,286 \pm 0,040$  (g) (**Figura 21 B**). A elevação da tensão de repouso induzida pelo eugenol na presença de 2-APB + PHE era cerca de 61% da força induzida por eugenol (5 mM) sozinho.



**Figura 20-** Efeitos do eugenol (5 mM) na presença de fenilefrina (PHE) (10  $\mu$ M) sobre o abalo e a tensão de repouso do músculo atrial. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 experimentos.



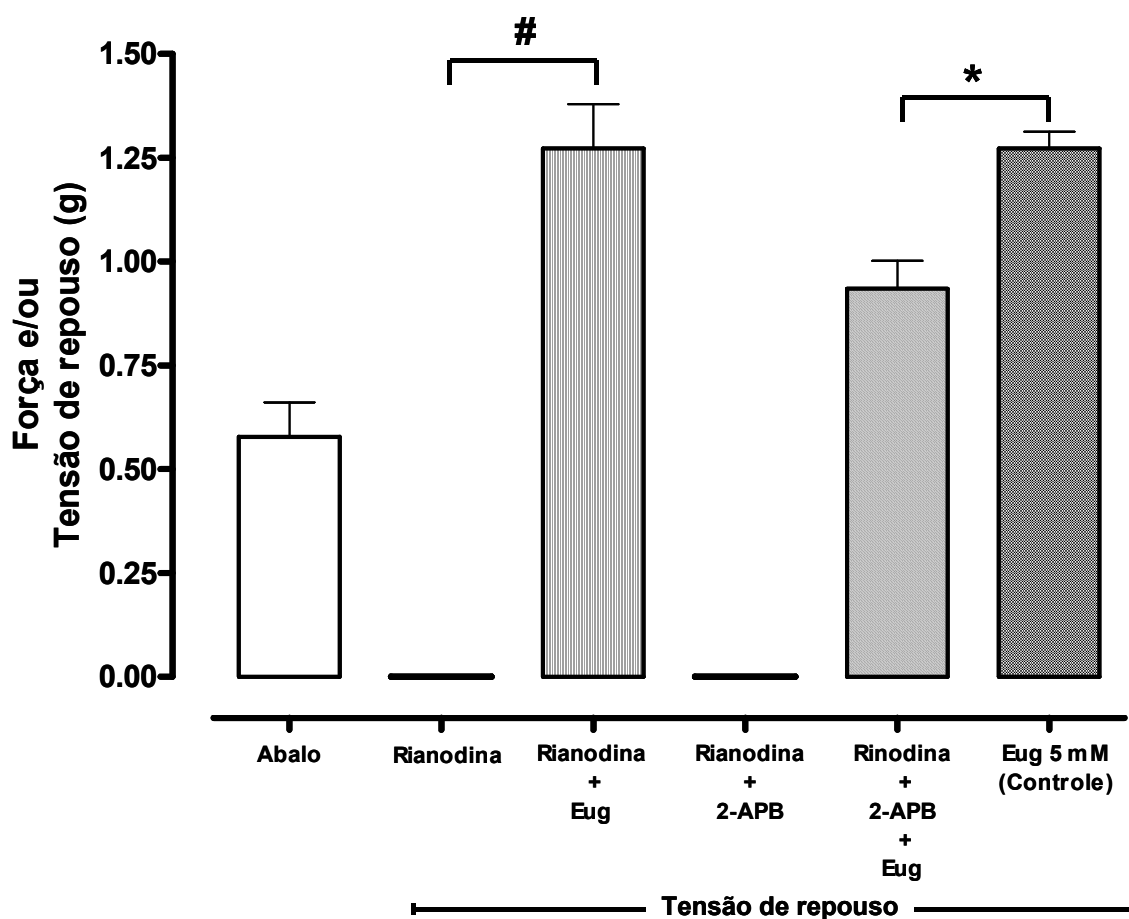
**Figura 21-** (A) Registro típico e (B) representação gráfica mostrando os efeitos da PHE (10  $\mu$ M), 2-APB (100  $\mu$ M) e Eugenol (5 mM) sobre o abalo e/ou tensão de repouso desenvolvida pelo músculo atrial. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 9 experimentos. #  $p < 0.01$  e \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; PHE + 2-APB + Eug vs PHE + 2-APB and PHE + 2-APB + Eug vs Eug (Controle).

### 1.6 – Efeitos do eugenol sobre os receptores de rianodina e os receptores IP<sub>3</sub>

No músculo liso, a concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) é afetada diretamente pelo retículo sarcoplasmático, do qual a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  é controlada por meio de dois importantes complexos receptores/canais: o receptor inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>R) e o receptor de rianodina (RyR) (O'Neill et al. 2004; MacMillan et al. 2005). Por outro lado, no espaço subsarcolemal dos miócitos atriais os IP<sub>3</sub>Rs estão co-localizados com os RyRs (Lipp et al. 2000; Wang et al. 2005). Apesar do fato da procaína ter se mostrado incapaz de inibir o desenvolvimento da tensão de repouso (contração) induzida pelo eugenol e objetivando nos assegurarmos que o eugenol poderia estar ou não agindo através dos IP<sub>3</sub>Rs e/ou RyRs, desenvolvemos dois outros protocolos. Inicialmente, o músculo atrial foi tratado com rianodina (100  $\mu\text{M}$ ) e, este bloqueador específico de RyRs aboliu o abalo muscular. Entretanto, quando o eugenol (5 mM) era adicionado à preparação este composto foi capaz de induzir uma elevação da tensão de repouso (contração) a qual, foi muito similar àquela desenvolvida pelo controle (Eugenol 5 mM). Em uma outra preparação, o músculo atrial foi tratado com rianodina (100  $\mu\text{M}$ ) e 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) e esses bloqueadores de canal aboliram completamente o abalo desenvolvido pelo músculo atrial. Entretanto, quando o eugenol (5 mM) foi adicionado à solução banho, este composto foi capaz de induzir uma elevação da tensão de repouso (contração) não tão significativa quanto àquela desenvolvida pelo controle (Eugenol 5 mM) (**Figura 22 e Tabela 3**).

	<b>Força (g)</b>	<b>N</b>
<b>Abalo</b>	0,578 ± 0,083	8
	<b>Tensão de repouso (g)</b>	<b>N</b>
<b>Rianodina + Eug</b>	1,272 ± 0,107	# 6
<b>Rianodina + Eug + 2-APB</b>	0,935 ± 0,067	* 6
<b>Controle (Eug [5 mM])</b>	1,273 ± 0,040	6

**Tabela 3-** Efeitos do eugenol (5 mM) sobre a tensão de repouso isométrica desenvolvida pelo músculo atrial na presença de rianodina (100  $\mu\text{M}$ ) e na presença de rianodina (100  $\mu\text{M}$ ) mais 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ). Os resultados são apresentados como média ± EPM. Teste t de Student; \* p<0,05; # p<0,01.



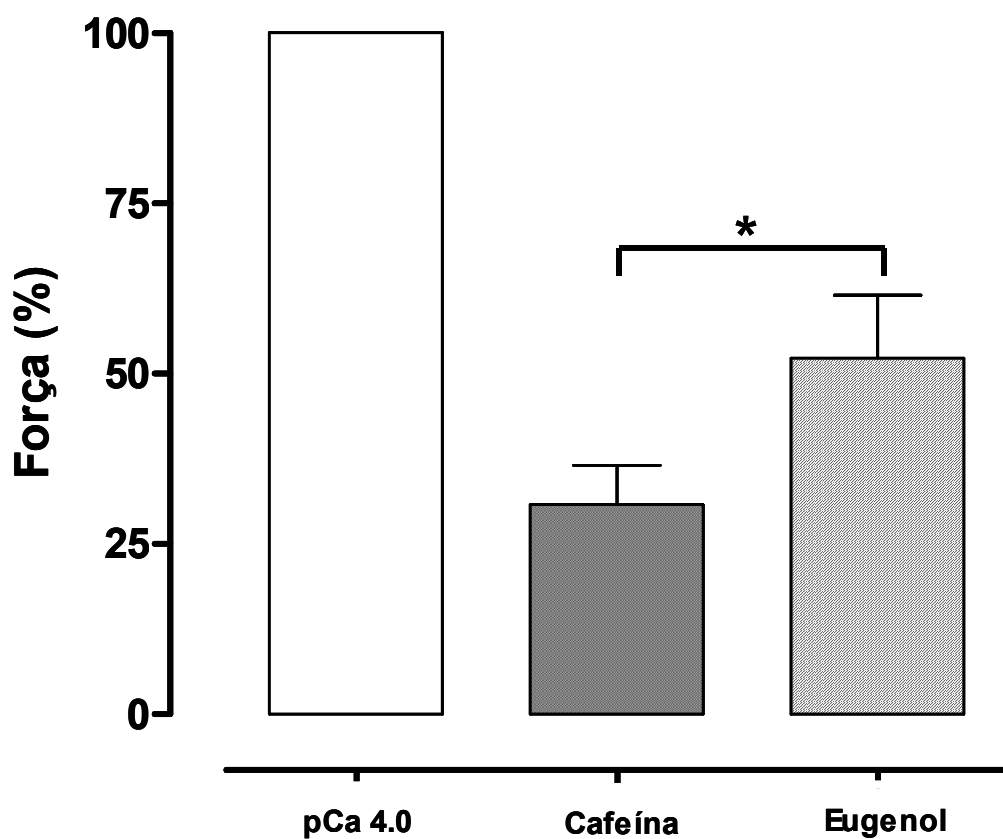
**Figura 22** – Efeitos do eugenol (5 mM) sobre a tensão de repouso isométrica desenvolvida pelo músculo atrial na presença de rianodina (100  $\mu$ M) e na presença de rianodina (100  $\mu$ M) mais 2-APB (100  $\mu$ M). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 7 experimentos. \*  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.01$ ; Teste t de Student; Rianodina + Eug vs Rianodina; and Rianodina + 2-APB + Eug vs Eug (Controle).

## 2 – EXPERIMENTOS COM FIBRAS PERMEABILIZADAS: TRABÉCULAS ATRIAIS

### 2.1– Experimentos com Fibras Atriais Permeabilizadas por Saponina (*Skinned Fibers*)

#### 2.1.1– Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC em fibras permeabilizadas por saponina

As fibras foram preparadas e montadas conforme foi descrito em materiais e métodos. Para a determinação da capacidade máxima de desenvolvimento de força, a preparação foi mergulhada em uma pequena cuba (*troff*) contendo Solução A (pCa 4.0 ( $-\log[\text{Ca}^{2+}]$ )). Para a determinação da força produzida pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS através dos RyRs, a preparação foi mergulhada em uma cuba contendo Solução E mais Cafeína (30 mM), um alcalóide agonista dos RyRs. Os efeitos do eugenol foram avaliados mergulhando-se as trabéculas permeabilizadas por saponina, em uma pequena cuba contendo Solução E acrescida de eugenol (5 mM). A **Figura 23** demonstra que o eugenol foi capaz de induzir uma produção de força significativamente superior à força produzida pela liberação de cálcio pela cafeína (30 mM). Os resultados sugerem que o eugenol poderia estar agindo por uma via capaz de prover uma liberação ainda maior de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS.



**Figura 23** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ANOVA, seguida pelo teste de Tukey; N = 7; Eugenol vs Cafeína.



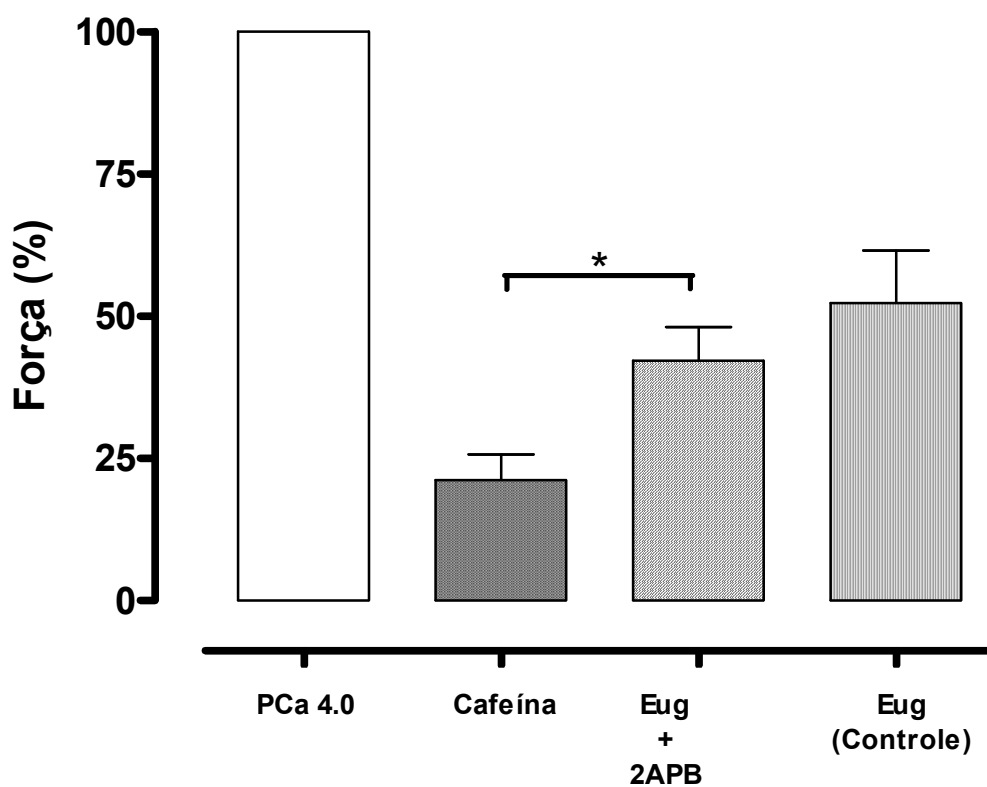
### 2.1.2– Efeitos eugenol sobre o AEC e a via IP<sub>3</sub>Rs

Os resultados obtidos nos experimentos com músculo intacto utilizando o bloqueador de IP<sub>3</sub>R mostram uma diminuição na força produzida por ação do eugenol. Para os experimentos com fibras permeabilizadas, elaboramos três protocolos experimentais objetivando avaliar os possíveis efeitos do eugenol sobre o processo de AEC através da via IP<sub>3</sub>Rs.

1) No primeiro protocolo utilizamos o 2-APB, um bloqueador não específico dos IP<sub>3</sub>Rs. Para tanto, a determinação da capacidade máxima de produção de força da preparação é obtida expondo a preparação a solução A (pCa 4,0 (-log[Ca<sup>2+</sup>])). A força produzida pela liberação do cálcio pelos RyRs do RS foi determinada ao mergulharmos a preparação em cuba contendo Solução E mais cafeína (30 mM). A avaliação da possível participação da via IP<sub>3</sub>R foi realizada mergulhando-se a preparação em cuba contendo Solução E acrescida de 2-APB e eugenol (5 mM). A **Figura 24** mostra a capacidade máxima de produção de força, induzida pela Solução A (**Tabela 4**) bem como a produção de força induzida pelo cálcio liberado via RyRs pela ação agonista da cafeína (30 mM) e, os efeitos induzidos pelo eugenol na presença e ausência de 2-APB (100 µM). Os resultados mostram que não há diferença entre a força induzida pelo eugenol na presença e ausência de 2-APB

	Força (%)	N
<b>pCa 4,0</b>	100,00 ± 0,00	7
<b>Cafeína</b>	21,15 ± 4,54	7
<b>Eug + 2-APB</b>	43,87 ± 5,33	7
<b>Eug - Controle</b>	52,27 ± 9,22	7

**Tabela 4-** Efeitos do eugenol (5 mM) sobre a força de contração desenvolvidas por trabéculas atriais permeabilizadas por saponina, na presença e na ausência de 2-APB



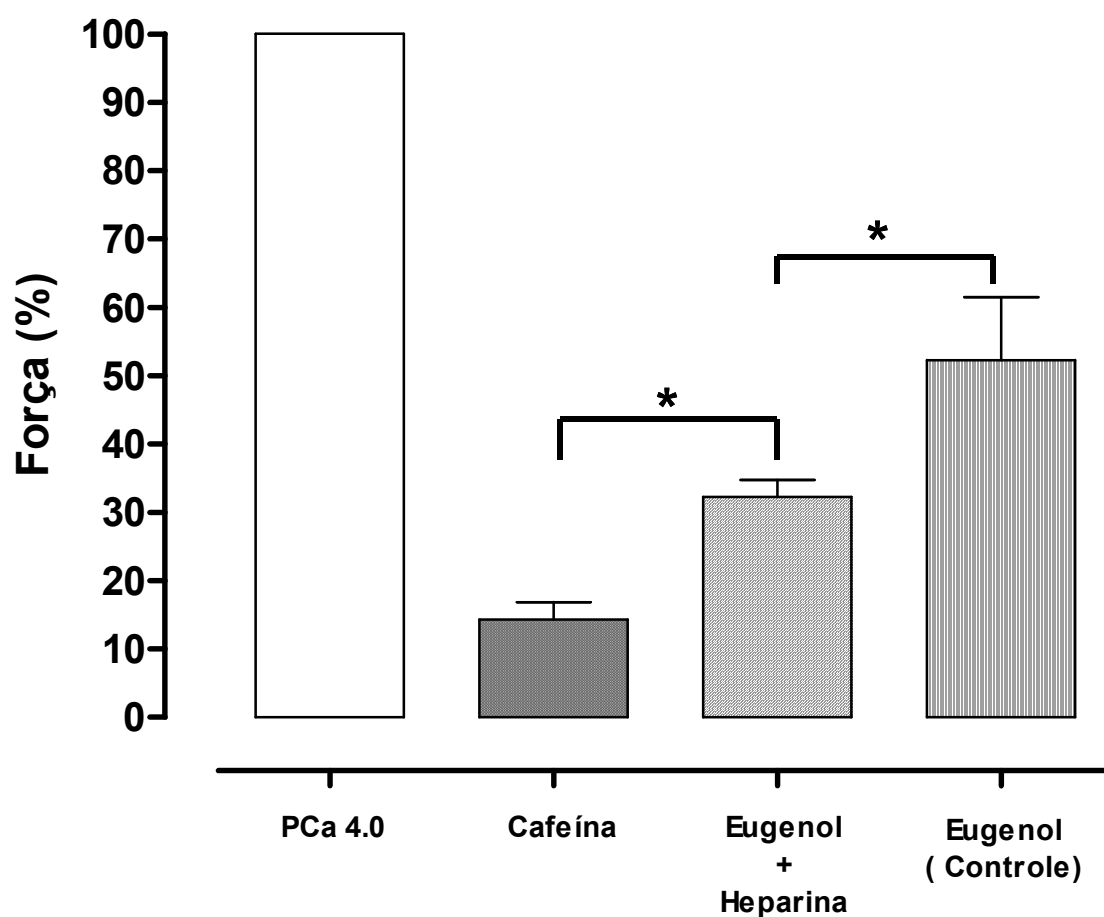
**Figura 24** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; Eugenol (Controle) vs Cafeína; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ANOVA e seguida pelo teste de Tukey; N = 7.

2) Num segundo protocolo, utilizamos a heparina, um conhecido bloqueador específico de  $IP_3Rs$ . Os procedimentos experimentais foram idênticos aos do protocolo anterior.

A **Figura 25** apresenta os dados de produção máxima de força induzidas pela ação da Solução A (**Tabela 1**); a produção de força induzida pela ação dos íons cálcio liberados via RyRs por ação do agonista cafeína e; a produção de força induzida pelo eugenol (5 mM) na presença e ausência de heparina (5 mg/ml). Nossos resultados sugerem que os dados apresentam uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos a produção de força induzida pelo eugenol na presença e ausência de heparina, indicando que a heparina, um bloqueador específico de  $IP_3Rs$ , induziu um bloqueio, ainda que parcial, da ação do eugenol em relação a produção de força. Os valores de media, erro médio e N amostral estão expressos na **Tabela 5**.

	Força (%)		N
pCa 4,0	100,00 ± 0,00		7
Cafeína	14,33 ± 2,500	*	7
Eug + Hep	32,28 ± 2,46	*	7
Controle	52,27 ± 9,22		7

**Tabela 5** – Efeitos do Eugenol (5 mM), sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos na presença e na ausência de Heparina (5 mg/ml).

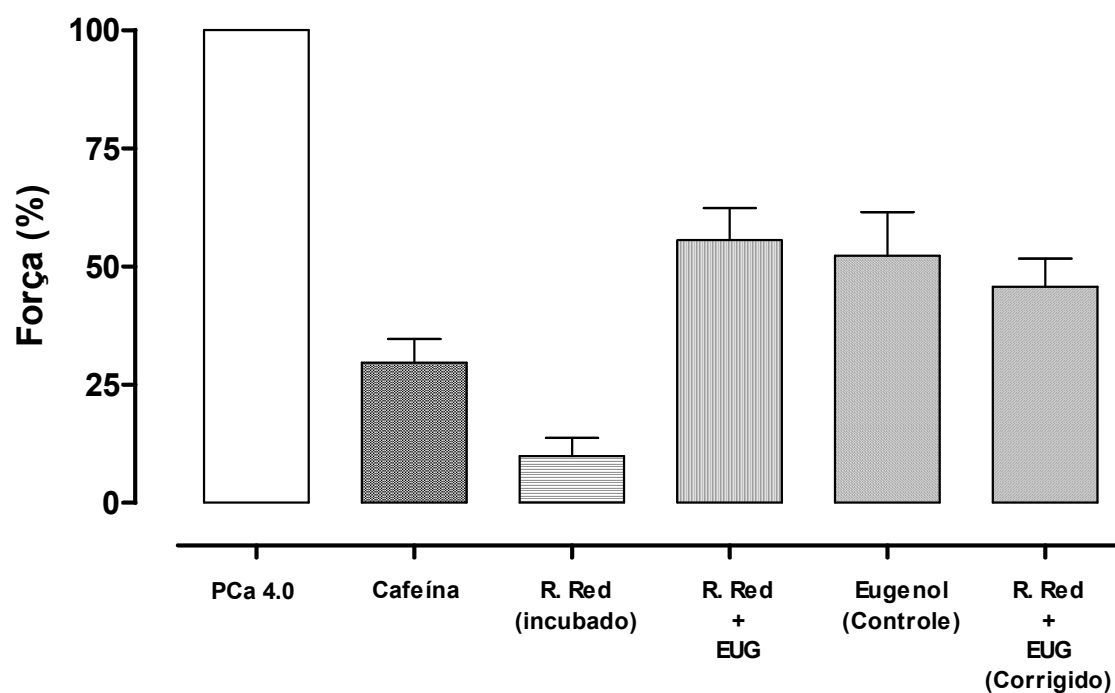


**Figura 25** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 7; Eugenol + Heparina vs Eugenol (Controle); Eugenol + Heparina vs Cafeína; Cafeína vs Eugenol (Controle).

**3)** Para nos certificarmos, mais uma vez, de que ação do eugenol no processo de AEC não esteja envolvendo a via dos RyRs desenvolvemos um outro protocolo no qual, as trabéculas atriais foram submetidas a um tratamento com ruthenium red (RR) um bem conhecido inibidor do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Gunter, 1990) bem como, um inibidor não específico de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS de músculos liso, esquelético e cardíaco (Chamberlain et al., 1984; Vites & Pappano, 1994). A **Figura 26** mostra a força máxima induzida pela Solução A (pCa 4,0) (**Tabela 1**); a força induzida pela ação dos íons cálcio liberados via RyRs, pela ação da cafeína (30 mM); a força induzida durante a fase de incubação da preparação com Ruthenium Red, e a ação do eugenol (5 mM) na presença e ausência de Ruthenium Red (10  $\mu\text{M}$ ). Os resultados mostram que o ruthenium red (10  $\mu\text{M}$ ) foi incapaz de bloquear a força de contração induzida pelo eugenol (5 mM).

	<b>Força (%)</b>	<b>N</b>
pCa 4,0	100,00 $\pm$ 00,00	7
Cafeína	29,67 $\pm$ 5,00	7
RR (inicial)	9,88 $\pm$ 3,86	7
RR + Eug	55,56 $\pm$ 6,74	7
Controle	52,27 $\pm$ 9,22	7
RR (cor)	45,67 $\pm$ 5,95	7

**Tabela 6** – Efeitos do *Eugenol*, sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos na presença e na ausência de Ruthenium Red

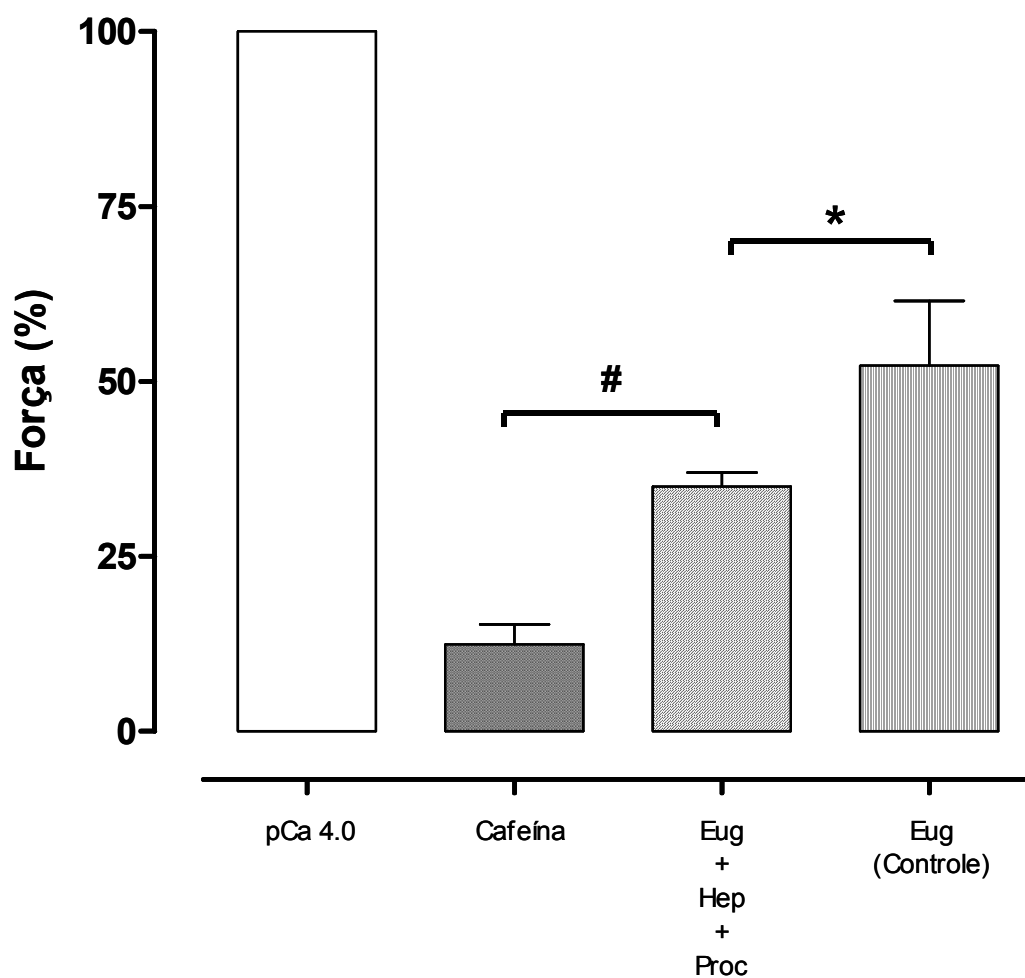


**Figura 26** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 7. Eugenol + Ruthenium red vs Cafeína; Eugenol (corrigido) vs Cafeína; Eugenol (Controle) vs Cafeína.

4) Em um novo protocolo experimental, utilizamos simultaneamente dois bloqueadores dos canais liberadores de cálcio do RS; a procaína, bloqueadora dos RyRs e, a heparina, bloqueadora dos IP<sub>3</sub>Rs. A **Figura 27** mostra a máxima produção de força induzida pela Solução A (**Tabela 1**), a força induzida pelos íons cálcio liberados via RyRs pela ação da cafeína (30 mM), a força induzida pelo eugenol (5 mM) na presença e ausência de heparina (5 mg/ml) e procaína (10 mM) em conjunto. Os resultados demonstram que mesmo em preparações em que as fibras permeabilizadas por saponina e tratadas simultaneamente com procaína e heparina o eugenol foi capaz de induzir uma força de contração estatisticamente igual à força de contração controle (**Tabela 7**).

	<b>Força (%)</b>	<b>N</b>
<b>pCa 4,0</b>	100,00 ± 00,00	7
<b>Cafeína</b>	12,40 ± 2,86	7
<b>Eug + Proc + Hep</b>	35,00 ± 2,00	7
<b>Eug Controle</b>	52,27 ± 9,22	7

**Tabela 7** – Efeitos do Eugenol, sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos na presença e na ausência de Heparina e Procaína



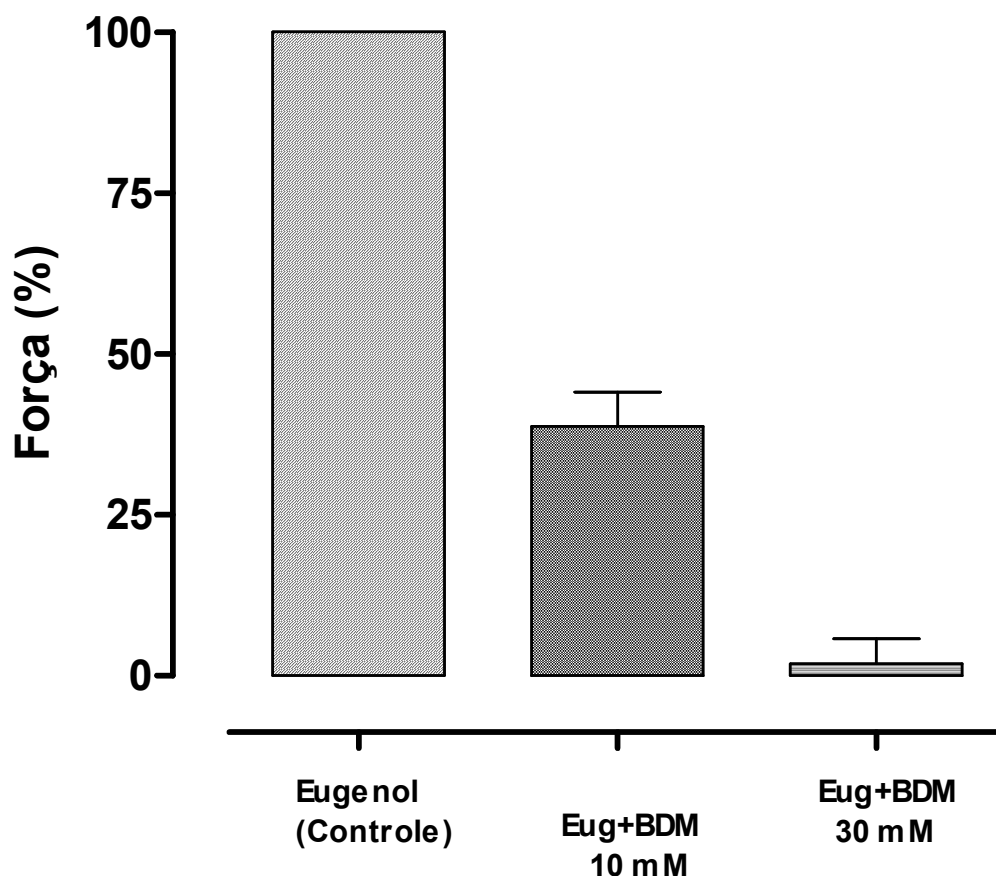
**Figura 27** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 7. Eugenol + Heparina + Procaína vs Cafeína; Eugenol + Heparina + Procaína vs Eugenol (Controle).



### 2.1.3 – Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina e tratadas com BDM

Os resultados dos protocolos realizados anteriormente, indicam uma ação do eugenol sobre o processo de AEC provavelmente por via dos IP<sub>3</sub>Rs. Entretanto, mesmo quando as trabéculas permeabilizadas eram tratadas com os bloqueadores de IP<sub>3</sub>Rs e de RyRs, como Heparina, 2-APB e Ruthenium red, o eugenol ainda assim, foi capaz de induzir uma força de contração superior à gerada pela ação da cafeína. Em consequência, tornou-se necessário avaliarmos se essa produção de força é ativa ou não, ou seja, se a produção de força seria uma consequência da ciclicização das pontes cruzadas ou apenas um estado de ligação constante como o observado em “*rigor mortis*”. Para esclarecermos esse questionamento, elaboramos um protocolo no qual utilizamos o BDM (monóxido de 2,3 butanediona), composto que reduz sensivelmente a capacidade máxima de geração de força pelo sistema contrátil (Li et al, 1984; Stephenson & West, 1989; Higuchi & Takemori, 1989).

A **Figura 28** mostra os valores, em percentual, da força máxima induzida pelo eugenol (5 mM); a força induzida pelo eugenol (5 mM) quando a trabécula permeabilizada foi tratada previamente com BDM (10 mM); ( $38,73 \pm 5,32$ ; N= 6) bem como, a força induzida pelo eugenol (5 mM) quando a trabécula permeabilizada foi tratada, desta feita, com BDM (30 mM) BDM ( $1,88 \pm 3,86$ ; N= 6). Nossos dados demonstram que o BDM (10 mM) foi capaz de induzir um bloqueio parcial sobre a força de contração induzida pelo eugenol (5 mM); entretanto, quando a concentração de BDM foi maior (30 mM), este composto foi capaz de bloquear quase completamente a força de contração induzida pelo eugenol (5 mM).



**Figura 28** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. As preparações foram submetidas à solução E acrescida de eugenol, e após a contração, a preparação foi transferida para um *troff* contendo solução E, eugenol (5 mM) e BDM (10mM) e (30 mM). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 6; Eugenol + BDM 10 mM vs Eugenol (Controle); Eugenol + BDM 30 mM vs Eugenol (Controle).

## 2.2 – Experimentos com Fibras Atriais Permeabilizadas por Triton X-100 1% (*Skinned Fiber*)

### 2.2.1 – Efeito do eugenol em fibras atriais permeabilizadas por Triton X-100 (1% - vol/vol)

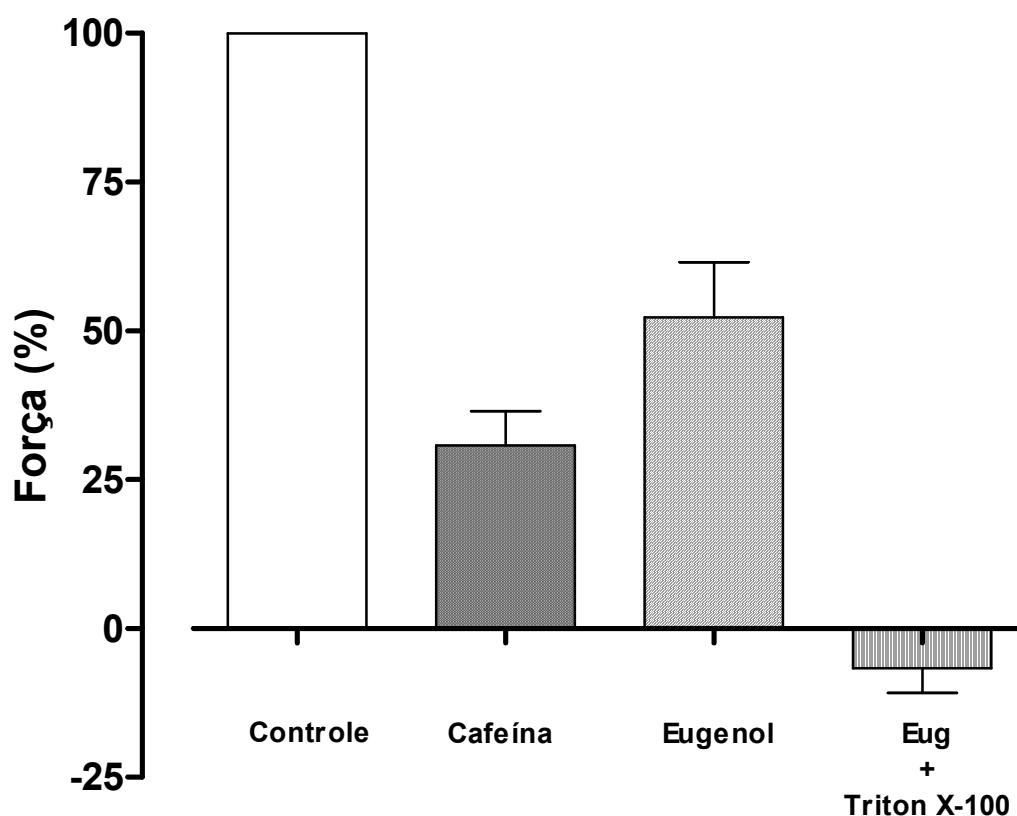
Os experimentos com permeabilização por Triton X-100 permitem determinar se a ação do eugenol se faz diretamente sobre o aparato contrátil ou não. Além disso, essa técnica possibilita ainda avaliarmos se a produção de força, inicialmente suposta ser devida à uma ação do eugenol, nada mais é que o resultado de um estado de “*rigor mortis*”.

A **Figura 29** mostra a força máxima induzida pela ação da Solução A (pCa 4,0) (**Tabela 1**); a força induzida pela ação dos íons cálcio liberados via RyRs devido à ação da cafeína; e a força induzida pelo eugenol (5 mM) na ausência e na presença de Triton X-100 (1% - vol/vol).

Nossos dados demonstram que o eugenol (5 mM) foi incapaz de induzir contração em trabéculas atriais após estas terem sido permeabilizadas por Triton X-100 (**Tabela 8**).

	Força (%)	N
pCa 4,0	100,00 ± 00,00	7
Cafeína	30,77 ± 5,73	7
Eugenol (5 mM)	52,27 ± 9,22	7
Eug (5 mM) + Triton (1% vol/vol)	-6,68 ± 4,17	# 7

**Tabela 8** – Efeitos do *Eugenol*, sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos na presença e na ausência de Triton X-100



**Figura 29** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. As preparações foram submetidas à solução R relaxante por alguns minutos, em seguida transferida para solução A para obtenção da força máxima; logo depois transferidas, por alguns minutos, novamente para solução R relaxante para quelar o cálcio livre; transferida para a solução L para carregar o RS de cálcio; em seguida transferida para solução E acrescida de Cafeína (30mM); novamente transferida para solução R relaxante para quelar o cálcio livre; novamente transferida para solução L para carregar o RS; e finalmente transferida para solução E acrescida de eugenol; após a contração induzida por eugenol, a trabécula foi transferida para outra solução E com eugenol e Triton X-100 (1%). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 7; Eugenol + Triton X-100 vs Eugenol; Eugenol + Triton X-100 vs Cafeína.

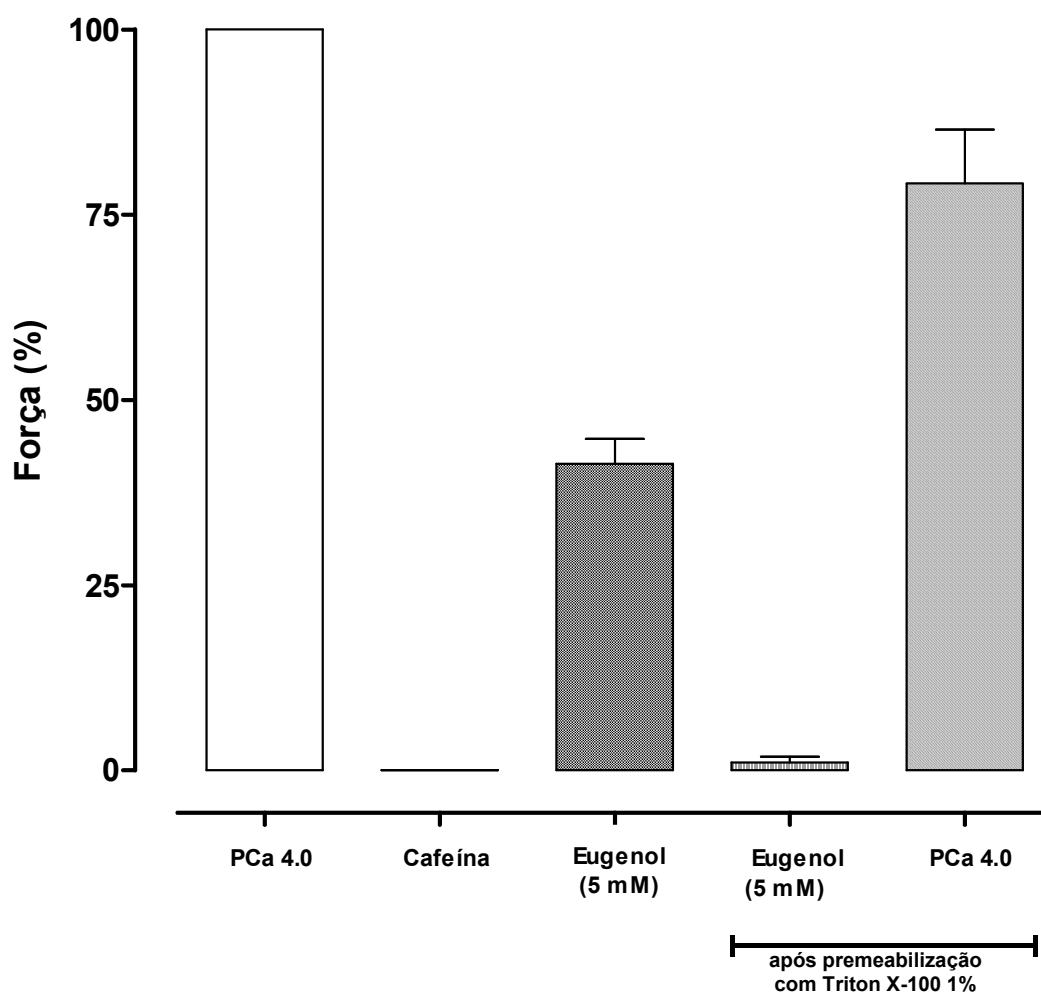
### 2.2.2– Efeitos do eugenol antes e depois da permeabilização com Triton X-100 (1% - vol/vol)

Para avaliarmos sobre uma possível ação lesiva do Triton X-100 sobre a ciclicização de pontes cruzadas ou, ainda, induzindo uma inibição da ação do eugenol sobre o aparato contrátil, desenvolvemos um protocolo realizado integralmente em solução R e com permeabilização por ação de Triton X-100 (1% - vol/vol).

A **Figura 30** mostra a força máxima induzida pela Solução A (**Tabela 1**); a ação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  liberados pela presença da cafeína (30 mM) foi inibida, ou seja, os íons foram quelados pela alta concentração de EGTA na solução R, representando a efetiva ação deste composto. Todavia, a mesma resposta não se repetiu na presença de eugenol (5 mM), o que sugere que a ação do eugenol poderia estar ocorrendo por uma via independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Logo após, a trabécula atrial foi submetida à permeabilização por Triton X-100 (1% - vol/vol). Nessa condição, a força induzida pelo eugenol (5 mM) foi completamente inibida; porém, quando a trabécula atrial foi mergulhada na cuba contendo Solução A com alta concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  a força de contração induzida por esta solução foi de mesma intensidade à observada antes da permeabilização por Triton X-100 (**Tabela 9**).

	Força (%)	N
pCa 4,0	100,00 ± 00,00	8
Cafeína (30 mM)	00,00 ± 00,00	8
Eugenol (5 mM)	41,38 ± 3,34	8
Eug (5 mM) após Triton X-100 1%	1,08 ± 0,75	8
pCa 4,0 após Triton X-100 1%	79,20 ± 7,30	8

**Tabela 9** – Efeitos do *Eugenol*, sobre a força de contração isométrica de músculo atrial de ratos antes e após a permeabilização com Triton X-100.



**Figura 30** – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos e posteriormente com Triton X-100 (1% - vol/vol). As preparações foram submetidas à solução R relaxante por alguns minutos, em seguida transferida para solução A para obtenção da força máxima; logo depois transferidas, por alguns minutos, novamente para solução R relaxante para quelar o cálcio livre; em seguida transferida para solução R acrescida de Cafeína (30 mM); novamente transferida para solução R relaxante para quelar o cálcio livre; transferida para solução R acrescida de eugenol; após a contração induzida por eugenol, a trabécula foi transferida para outra solução R com Triton X-100 (1%) e incubada neste ambiente por 10 minutos para ação permeabilizante do Triton X-100; transferidas após novamente para solução R acrescida de Cafeína (30 mM); lavagem em solução R; transferida para solução R acrescida de Eugenol (5 mM); lavagem em solução R; transferida para solução A. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, corrigidos para percentual da força máxima obtida na solução A; #  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Teste t de Student; N = 8; Eugenol vs pCa4.0; Eugenol vs pCa 4,0 depois de Triton X-100.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que em preparações de músculo atrial submetidas à estimulação elétrica, o eugenol foi capaz de inibir completamente a contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial de ratos. Além disso, nas concentrações utilizadas, o eugenol, foi capaz de induzir uma elevação da tensão de repouso. Nos experimentos com trabécula de músculo atrial permeabilizadas por saponina e/ou Triton X-100, o eugenol foi capaz de induzir contração envolvendo nessa resposta uma participação, ainda que parcial, da via dos receptores  $IP_3$  e, possivelmente, uma via independente de cálcio.

Os eventos que ocorrem entre o potencial de ação na fibra muscular e sua contração são definidos como sendo o processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC) (Bers, 2002). Entre os íons envolvidos no complexo mecanismo de trabalho do coração, o cálcio pode ser, talvez, considerado como o mais importante. Ele é crucial para os mecanismos que habilitam as câmaras cardíacas do coração a se contraírem e a se relaxarem, um processo denominado acoplamento excitação-contração (Bers, 2002).

O papel do cálcio como agente desencadeador da contração cardíaca foi sugerido pela primeira vez em 1883, quando Ringer observou que corações colocados numa solução sem cálcio paravam de bater (Ringer, 1883).

Passaram-se décadas até que os principais sistemas responsáveis pelo efeito ativador do cálcio sobre o coração viessem ao foco de interesse. Assim, somente no final dos anos 60, os principais sistemas que possibilitam o cálcio a regular a contratilidade miocárdica foi enfatizada (Katz, 2001). Entretanto, duas importantes lacunas, as propriedades dos canais intracelulares liberadores de cálcio que possibilitam o cálcio sair do retículo sarcoplasmático (Inui *et al.*, 1987, a, b) e a existência da  $Ca^{2+}$ -ATPase na membrana plasmática que, junto com o trocador sódio-cálcio bombeia cálcio para fora da célula (Caroni & Carafoli, 1980) foram completadas somente nos anos 80.

Um modelo descritivo tem sido desenhado para explicar as propriedades funcionais da célula cardíaca (Schouten *et al.*, 1989). Durante o potencial de ação o  $Ca^{2+}$  entra na célula através de uma proteína que é sensível à diidropiridina, “canal DHPR” ou “canal de  $Ca^{2+}$  tipo L”. O influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de  $Ca^{2+}$  tipo L nos túbulo-T inicia o processo de acoplamento excitação-contração (AEC) ao

disparar a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos receptores de rianodina (RyRS) na cisterna terminal; processo esse denominado “liberação de cálcio induzida por cálcio” (CICR, Fabiato, 1985). Apesar do mecanismo dominante no processo de AEC em músculo cardíaco ser a CICR, têm surgido evidências a favor de um mecanismo de liberação de cálcio induzido por  $\text{IP}_3$ . No coração, o papel da via mediada por  $\text{IP}_3$  no processo de AEC tem sido proposto com bases em estudos que sugerem a liberação de cálcio induzida por  $\text{IP}_3$  e contração do músculo cardíaco (Fabiato and Fabiato, 1983; Fabiato, 1990; Moschella and Marks, 1993). Existe uma diversidade enorme de sinais celulares de cálcio havendo, portanto, múltiplos mensageiros e canais através dos quais a elevação do cálcio citosólico pode ocorrer. Guardadas as especificidades dos mensageiros liberadores de cálcio, sabe-se que deve existir diferentes tipos de canais liberadores de cálcio, apesar de até o momento apenas os RyRs e os  $\text{IP}_3$ Rs terem sido caracterizados detalhadamente (Bootman et al., 2002). Uma característica fundamental tanto para os  $\text{IP}_3$ Rs como para os RyRs, é a de que o próprio  $\text{Ca}^{2+}$  regula sua abertura (Yang et al., 2002). Em miócitos atriais, a liberação de cálcio a partir do RS durante o processo de AEC ocorre primariamente através dos RyRs (Kockskämper et al., 2001; Sheehan and Blatter, 2003). Contudo, no músculo atrial a liberação de cálcio dependente de  $\text{IP}_3$  exerce um importante papel modulatório para a sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  durante o AEC por facilitar a liberação de cálcio via RyRs. A liberação de cálcio dependente de  $\text{IP}_3$  também exerce uma pequena contribuição direta para a concentração intracelular de cálcio  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Zima and Blatter, 2004). Assim, a liberação de cálcio a partir dos  $\text{IP}_3$ Rs pode levar a mudanças críticas na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no microambiente dos RyRs o que facilita o processo de CICR através dos RyRs circunvizinhos. Assim,  $\text{IP}_3$  pode exercer um efeito inotrópico positivo aumentando a liberação de cálcio a partir do RS e, conseqüentemente a contração muscular. Isto pode, sem dúvida, representar um mecanismo através do qual agentes neurohumorais tais como agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, angiotensina II ou endotelina modulam a sinalização do cálcio cardíaco e a contratilidade (Zima and Blatter, 2004).

O eugenol, além de ser o principal constituinte do óleo de cravo, também é componente constituinte dos óleos essenciais ou extratos de muitas outras plantas, como a canela e o manjeriço (Thompson et al., 1989; Wrigth et al., 1995). Ao longo dos anos, o eugenol tem sido utilizado como valiosa ferramenta na tentativa de melhor elucidar os eventos relacionados ao processo de AEC. Trabalhos realizados



com músculos papilares de ratos demonstraram que o eugenol em baixas concentrações (0,01 – 0,5 mM),—apresenta ação inotrópica negativa agindo como bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L, mas, apesar de incapaz de afetar a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase miosínica (Damiani et al., 2004).

Em outro estudo, foram investigados os efeitos do eugenol em elevadas concentrações (1 – 10 mM), sobre o RS bem como sobre o aparato contrátil de fibras musculares esqueléticas de rã e quimicamente desmembranadas. Os resultados mostraram que o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir contrações possivelmente através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Além disso, os autores concluíram que a contração muscular induzida pelo eugenol envolveria, pelo menos, dois mecanismos para a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS: um mecanismo relacionado com a ativação dos RyRs e, um outro mecanismo através de uma via sensível à heparina ou, mais precisamente, uma via  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (Lofrano-Alves et al.; 2005).

Os experimentos com músculo atrial intacto e sob estimulação condição-padrão, mostraram que o eugenol em diferentes concentrações (1 -10 mM), foi capaz de abolir o abalo muscular, bem como, de forma concentração-dependente, foi capaz de induzir uma elevação da linha de tensão de repouso. Tal evento caracteriza, portanto, a capacidade do eugenol, nas concentrações utilizadas, em induzir contração muscular atrial. Tais resultados são similares aos encontrados em preparações com músculo esquelético de rã (Lofrano-Alves, et al.; 2005).

No músculo cardíaco, a força da contração é dependente da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_0$ . É atualmente aceito, que o cálcio requerido para a contração provem de duas fontes: **1)** o influxo de cálcio extracelular através dos canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (DHPRs) e, **2)** do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RyRs, principalmente). O cálcio proveniente do meio extracelular passa ao interior da célula e dispara a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. É estimado que cerca de 30% do  $\text{Ca}^{2+}$  requerido para elevar a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a concentrações necessárias para o desenvolvimento da força máxima, é derivado do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema e o restante 70% representa o  $\text{Ca}^{2+}$  ativador derivado do retículo sarcoplasmático (Sperelakis *et al.*, 1996). Uma série de informações pode ser obtida a partir dos registros de experimentos onde utilizamos uma droga bloqueadora de canais liberadores de cálcio do RS. Tem sido descrito que a inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por eugenol (Damiani et. al., 2004) ou por  $\text{Ni}^{2+}$

resulta em uma elevada concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo retículo sarcoplasmático (Komai & Rusy, 1993). Tal raciocínio é exatamente o oposto à noção de que a inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  invariavelmente resultaria numa diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Nossa hipótese é a de que a elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado a partir do RS, seja, possivelmente, um resultado independente da inibição, pelo eugenol, do influxo extracelular deste íon. O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, poderia então, ser um resultado da ação direta do eugenol sobre os canais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Um dos principais efeitos da procaína sobre célula muscular é a capacidade de inibir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (Endo, 1977; Stephenson & Wendt, 1986). Assim, nos utilizamos procaína para observar os efeitos do eugenol sobre a liberação de cálcio pelo RS (Zahradníková & Palade, 1993). Nossos resultados mostram que a procaína foi capaz de bloquear completamente a contração isométrica (abalo) desenvolvida pelo músculo atrial; todavia, quando o eugenol foi adicionado à preparação, este composto foi capaz de induzir uma grande elevação na linha de tensão de repouso. Tais resultados mostram que a procaína efetivamente produziu um efeito bloqueador nos RyRs do retículo sarcoplasmático, mas quando o eugenol foi adicionado o músculo respondeu com grande força de contração. Assim sendo, os resultados sugerem que o eugenol poderia estar atuando por uma via diferente da dos RyRs.

O processo de AEC envolve os canais de cálcio tipo L voltagem-dependentes (DHPRs) os quais medeiam a entrada de cálcio e cuja atividade resulta na liberação de cálcio via RyRs (Xu et al., 1994) ou de outro canal liberador de cálcio do RS (Moore et al., 2004). Dessa forma, a utilização de uma solução sem cálcio (Solução de Ringer Zero-cálcio) nos deu a certeza de que o cálcio extracelular não estaria efetivamente contribuindo para o processo de liberação de cálcio induzida por cálcio. Além disso, a adição de procaína à solução não permitiria a liberação de cálcio através dos RyRs do RS. Entretanto, quando nessas condições experimentais o eugenol foi adicionado à preparação, o eugenol, mais uma vez, foi capaz de induzir uma grande elevação na linha de tensão de repouso. Tais resultados mostram que a despeito do fato do processo de CICR não poder ocorrer pela ausência completa do cálcio extracelular bem como, a pouca probabilidade de ocorrência da liberação de cálcio pelos RyRs devido ao bloqueio pela procaína, mesmo assim, o eugenol foi capaz de induzir significativa força de contração.

Recentemente, a liberação de cálcio, induzida por despolarização, a partir dos estoques intracelulares (RS) na ausência de cálcio extracelular tem sido demonstrada em músculo liso (del Valle-Rodriguez, 2003). Tal fenômeno fomenta a intrigante possibilidade de que algum componente da liberação de cálcio voltagem-dependente em músculo liso poderia estar envolvendo a sucessiva atividade dos dois tipos canais liberadores: canal  $IP_3$  (via uma Proteína-G) e canal RyRs (del Valle-Rodriguez, 2003) de maneira independente da permeação de cálcio (Moore, et al., 2004). Sabemos que em nenhum dos mecanismos apresentados até aqui, envolve a via dos  $IP_3$ Rs e fatores que ativam a fosfolipase C (PLC). Os receptores de inositol trifosfato ( $IP_3$ Rs) são receptores unipresentes em diferentes tipos de tecido. No músculo cardíaco, eles também estão presentes embora em quantidades inferiores àquela relacionada aos receptores de rianodina (RyRs), os quais se constituem como a principal fonte de cálcio no processo de AEC (Wu et al., 2006). O tipo 2 de  $IP_3$ Rs ( $IP_3R2$ ) é o subtipo predominante nos miócitos cardíacos (Perez et al., 1997), porém, o seu papel no coração ainda é pouco compreendido. Nos miócitos atriais, alguns  $IP_3$ Rs estão localizados próximos aos RyRs nos sítios liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático na periferia da célula; e assim, podem contribuir modulando o processo de AEC (Mackenzie et al., 2002; Zima & Blatter, 2004). Até o presente, temos poucas substâncias antagonistas que possam ser utilizadas objetivando uma melhor contribuição dos  $IP_3$ Rs nas respostas celulares. Um dos mais rotineiramente utilizados é a heparina, todavia, este composto é de uso limitado visto que apresenta múltiplas ações. Dentre tais ações, podemos destacar o seu elevado peso molecular, o que dificultaria sua permeação através do sarcolema (em experimentos com estimulação elétrica indireta) (Jonas et al., 1997); sua capacidade em desacoplar a sinalização via proteína-G e, ainda, o fato de ser capaz de ativar os RyRs (Peppiatt, et al., 2003). Xestosponginas, as quais foram descritas inicialmente como um antagonista relativamente específico de  $IP_3$ Rs por Gafni et al, 1997; tem sido utilizado para avaliar se os  $IP_3$ Rs estão envolvidos em algum tipo particular de resposta. Apesar de haver diferentes tipos de xestosponginas inibindo a sinalização do cálcio, seu mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido. Além do mais, xestosponginas apresentam um custo muito elevado, são lentas no seu mecanismo de ação e não tem sido cientificamente bem sucedida (Solovyova et al., 2002). 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) foi introduzido como um agente antagonista de  $IP_3$ Rs por Maruyama et al., 1997. Desde então ele tem sido utilizado em muitos

estudos para avaliar a contribuição dos IP<sub>3</sub>Rs na sinalização celular do cálcio (Bootman et al., 2002; Peppiatt, et al., 2003). Ao contrário das xestosponginas, as quais podem inibir tanto os IP<sub>3</sub>Rs quanto os RyRs, 2-APB provavelmente não apresenta nenhuma ação sobre estes últimos tipos de canais. No músculo estriado o 2-APB não afeta a liberação de cálcio induzida por cafeína (Maruyama et al., 1997). Além do mais, em músculo liso, o 2-APB inibiu a resposta contrátil induzida por InsP<sub>3</sub>, mas não aquelas contrações desencadeadas por despolarização induzidas por KCl (Maruyama et al., 1997; Ascher-Landsberg et al., 1999; Potocnik & Hill, 2001). Tal fato sugere não haver qualquer efeito sobre a entrada de cálcio por canais operados por voltagem bem como sobre as proteínas contráteis (Peppiatt, et al., 2003). Apesar do 2-APB não apresentar qualquer efeito sobre os RyRs ou sobre os canais de cálcio operados por voltagem, ele não pode ser considerado como um agente totalmente específico para os IP<sub>3</sub>Rs (Bootman et al., 2002). Em nossos experimentos, quando a preparação foi tratada com 2-APB, a resposta contrátil (elevação da linha de tensão basal) apresentou forte desvio para a direita, indicando que este composto foi capaz de deprimir a liberação de Ca<sup>2+</sup> do RS, possivelmente, pelo bloqueio dos IP<sub>3</sub>Rs, entretanto, não foi capaz de abolir totalmente a contração isométrica. Quando, a esta preparação, foi adicionado eugenol, este foi capaz de abolir totalmente a contração isométrica, de forma concentração dependente (1 – 10 mM). Entretanto, também, de forma concentração dependente, o eugenol foi capaz de induzir o desenvolvimento de força, observada pela elevação de linha de tensão basal. Esta resposta embora tenha sido significativamente diminuída em relação ao controle, ela não foi totalmente abolida. Assim, nossos resultados sugerem que o eugenol estaria atuando pela via IP<sub>3</sub>Rs mas, certamente, também estaria atuando por uma outra ainda desconhecida via de ação.

Na literatura encontramos relatos sobre possíveis efeitos tóxicos induzidos pelo eugenol (Hagan *et al.*, 1965; Ozeki, 1975; Ohkubo & Kitamura, 1997; Nishijima *et al.*, 1998), os quais poderiam produzir efeitos irreversíveis. A exposição humana ao eugenol ocorre durante tratamento dentário, onde ele é usado como analgésico e antisséptico, na forma de óleos ingeríveis, condimento e como aromatizante de alimentos bem como pelo uso por fumantes de cigarros a base de cravo (Wright *et al.*, 1995). A aplicação de eugenol à mucosa oral em odontologia causa inflamação tecidual e necrose celular (Kozam & Mantell, 1978). A ingestão oral de alimentos que contenham eugenol não tem sido encontrada como sendo pró-inflamatória ou

carcinogênico. Entretanto, cigarros a base de cravo, produzidos a partir de uma mistura de tabaco com cravo macerado, muito popular entre jovens adultos nos Estados Unidos e até mesmo no mundo, tem sido relatado como sendo uma possível causa para o rápido início de um broncoespasmo, hemoptose e edema pulmonar não cardiogênico (Hirs, 1984; Hackett *et al.*, 1985). Existe um único relato a respeito de um paciente que desenvolveu um edema pulmonar não cardiogênico após auto injetar eugenol via intravenosa (Kirsch *et al.*, 1990). Estudos toxicológicos iniciais demonstraram que a administração de eugenol em animais experimentais resultou em lesão pulmonar aguda (Hagan *et al.*, 1965; LaVoie *et al.*, 1986). Pesquisas mais recentes indicam que o eugenol causa edema pulmonar hemorrágico com seqüestro intrapulmonar de neutrófilos devido, ao menos parcialmente, a mecanismos oxidantes (Wrigh *et al.*, 1995). Apesar dos inúmeros estudos sobre o eugenol, pouco se sabe sobre seus mecanismos tóxicos ou sobre a formação de reativos intermediários durante o metabolismo desse composto (Thompson *et al.*, 1989). Assim sendo, poderíamos considerar a possibilidade de que o tal efeito depressor observado nos músculos atriais quando sob estimulação elétrica indireta e tratado com 2-APB e eugenol, poderia ser devido a uma perda na capacidade contrátil dos filamentos no decorrer do experimento. Assim, para assegurar que o deslocamento à direita observado na linha de tensão de repouso desenvolvida pelos músculos atriais sob estimulação elétrica indireta e, tratados com 2-APB e eugenol, não estava relacionada com a fadiga celular, foram realizados experimentos com controle temporal da viabilidade da preparação. Assim, logo após a realização completa do protocolo experimental, os músculos atriais foram lavados por 3 vezes com solução de Ringer e mantidos por mais 40 minutos em Solução Ringer (normal) e sob estimulação elétrica indireta constante. Ao final desse período de tempo, as preparações haviam recuperado sua capacidade contrátil em cerca de 65% em relação ao controle. Assim posto, nossos resultados sugerem que nem o 2-APB e nem o eugenol, nas condições experimentais empregadas, foram lesivos aos músculos atriais.

A estimulação do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico ( $\alpha_1$ -AR) desempenha importante papel na regulação da contração cardíaca, no crescimento celular, na hipertrofia cardíaca e na cárdio-proteção (Li *et al.*, 1997). Classicamente, os  $\alpha_1$ -ARs são acoplados via proteínas G ( $G_q$ ) insensíveis a toxina pertussis (PTX), apesar de acoplamento à proteína  $G_i$  já ter sido relatado (Steinberg *et al.*, 1985; Han *et al.*,

1989; Keung & Karliner, 1990; Perez et al., 1993). Em geral, a estimulação  $\alpha_1$ -adrenérgica ativa a fosfolipase C (PLC) que, por sua vez, induz a hidrólise do fosfatodilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), levando a produção de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-tifosfato ( $\text{IP}_3$ ). O DAG ativa a proteína cinase C (PKC) e, no músculo cardíaco  $\text{IP}_3$  aumenta a liberação intracelular de cálcio (Nosek et al., 1986; Fabiato, 1986; Zima & Blatter, 2004). Apesar da sinalização via  $\text{IP}_3$  estar relacionada ao processo de acoplamento excitação-contração (AEC) atrial e/ou arritmias atriais (Lipp et al., 2000; Mackenzie et al., 2002; Zima & Blatter, 2004), o papel fisiológico da sinalização via  $\text{IP}_3$  em músculo atrial ainda permanece pouco esclarecida (Wang et al., 2005). Em geral, a fenilefrina (PHE), um agonista  $\alpha_1$ -AR, exerce efeitos positivos inotrópicos em músculo ventricular de adultos (Hartmann et al., 1988; Hescheler et al., 1988; Ertl et al., 1991; Terzic et al., 1992), bem como em músculos atriais de ratos (Ertl et al., 1991; Jahnel et al., 1994) e de humanos (Schumann et al., 1978; Skomedal et al., 1985; Jahnel et al., 1992a). Em músculo atrial de ratos, a PHE aumenta a concentração intracelular de cálcio via estimulação dependente de PKC dos canais de cálcio voltagem dependentes (Jahnel et al., 1994) e, em parte, possivelmente via alterações secundárias no Trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Jahnel et al., 1991, 1992b, 1994). Em nossos experimentos, a adição de PHE (10  $\mu\text{M}$ ) à preparação, induziu um efeito inotrópico positivo da contração isométrica do músculo atrial. Quando houve a adição de eugenol (5 mM) à esta mesma preparação, o eugenol, de modo imediato, inibiu totalmente a força de contração isométrica desenvolvida pelos músculos atriais. Entretanto, decorridos 30 minutos após o efeito inicial do eugenol, observamos que este composto foi capaz de elevar significativamente a linha de tensão de repouso do músculo atrial. Esses resultados sugerem que o eugenol foi capaz de induzir contração (igual ou maior àquela induzida pela PHE) e que, possivelmente este composto estaria, de alguma forma, potencializando a contração induzida pela PHE e/ou potencializando a contração por uma via independente de  $\text{IP}_3\text{Rs}$ .

Para melhor elucidar qual seria (ou quais seriam) a via de ação do eugenol sobre o processo de AEC do músculo atrial, em outro grupo experimental, após a PHE (10  $\mu\text{M}$ ) ter induzido seu efeito inotrópico positivo, foi adicionado 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) à preparação. Observou-se, então, que o 2-APB reduziu significativamente a força da contração isométrica desenvolvida pelos músculos atriais, mas, foi incapaz de extingui-la totalmente. Tal resultado mostra que o 2-APB foi capaz de bloquear os

IP<sub>3</sub>Rs, porém, não de forma específica. Tais resultados corroboram aos relatados por Bootman et al., 2002, que concluem afirmando que o 2-APB não pode ser usado simplesmente como um antagonista específico de IP<sub>3</sub>Rs já que ele poderia apresentar outros efeitos. Por outro lado, quando a essa mesma preparação foi adicionado o eugenol (5 mM), este foi capaz de induzir uma significativa elevação da linha de tensão de repouso, ou seja, o eugenol foi capaz de induzir contração de intensidade de cerca de 60% em relação à intensidade da contração controle (eugenol 5 mM). Tais resultados, uma vez mais, sugerem que o eugenol teria, possivelmente, uma ação via IP<sub>3</sub>Rs e uma outra via independente dos IP<sub>3</sub>Rs.

A regulação do processo de acoplamento excitação-contração é orquestrado por meio de um programa espacialmente definido de canais iônicos e trocadores, os quais, controlam rigorosamente a entrada de Ca<sup>2+</sup> para dentro da célula bem como, a liberação de Ca<sup>2+</sup> a partir do retículo sarcoplasmático. Apesar do fato de que o processo seja centralizado basicamente em torno do Ca<sup>2+</sup>, parece ainda não haver um papel substancial para os IP<sub>3</sub>Rs e sua associada liberação de Ca<sup>2+</sup> na regulação do AEC em condições fisiológicas (Woodcock & Matkovich, 2005). No coração, o controle da liberação de Ca<sup>2+</sup> e, conseqüentemente, a regulação da contratilidade é desempenhada predominantemente por meio da atividade elétrica no sarcolema. O potencial de ação cardíaco é iniciado pela despolarização do sarcolema e sustentado na fase do platô (Fase 2 do potencial de ação cardíaco) por meio da ativação dos canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L (I<sub>Ca,L</sub>) (DHPRs). A entrada de Ca<sup>2+</sup> através desses canais induz a liberação de Ca<sup>2+</sup> do RS por meio dos RyRs. Os RyRs se constituem no tipo de canal de Ca<sup>2+</sup> em maior abundância no interior do miócito cardíaco. O Ca<sup>2+</sup> assim originado aumenta a contração dos filamentos através da sua interação com a troponina C e, subseqüente aumento da interação actina-miosina (Williams et al., 1992; Minamikawa et al., 1997). Existem poucas dúvidas de que os miócitos cardíacos expressam o tipo 2 de IP<sub>3</sub>Rs. Está demonstrado que esses canais são funcionais e estão localizados nas mesmas regiões celulares como os juncionais RyRs, os quais estão mais diretamente envolvidos com o processo de AEC. Dada a essa grande proximidade entre esses dois tipos de canais liberadores de Ca<sup>2+</sup> torna-se pertinente especular que a liberação de Ca<sup>2+</sup> através dos IP<sub>3</sub>Rs ative os RyRs e, essa interrelação possa, portanto, aumentar o processo de AEC (Lipp et al., 2000). Dentro dessa linha de raciocínio, desenvolvemos um protocolo onde as preparações atriais, após período de estabilização e mantidas sob estimulação-padrão, foram

tratadas com rianodina (100  $\mu$ M), um conhecido antagonista específico para os RyRs. Imediatamente após a adição de rianodina, observamos a completa abolição da força da contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial. Todavia, quando a essa preparação foi adicionado eugenol (5 mM), este composto foi capaz de induzir uma significativa elevação da linha de tensão de repouso, ou seja, induziu contração. Essa contração induzida pelo eugenol, apresentava a mesma amplitude de força que a desenvolvida pelo eugenol (5 mM) na condição de controle. Tal resultado nos sugere que a contração induzida pelo eugenol, possivelmente, não seria resultado da ação desse composto sobre os RyRs. Por outro lado, considerando a grande proximidade e a descrita interrelação entre os RyRs e os IP<sub>3</sub>Rs, desenvolvemos um novo protocolo onde as preparações atriais, após período de estabilização e mantidas sob estimulação-padrão, foram tratadas com rianodina (100  $\mu$ M) mais 2-APB (100  $\mu$ M), um antagonista de IP<sub>3</sub>Rs. Imediatamente após o tratamento, observamos a completa abolição da força da contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial. Quando a esta preparação foi adicionado eugenol (5 mM), este composto foi capaz de induzir uma significativa elevação da linha de tensão de repouso, ou seja, o eugenol induziu contração. Essa contração induzida pelo eugenol, embora muito significativa, apresentava uma amplitude de força cerca de 26% menor em comparação à amplitude de força induzida pelo eugenol (5 mM) na condição de controle. Tal resultado sugere que o eugenol estaria, possivelmente agindo via IP<sub>3</sub>Rs mas, provavelmente, também estaria agindo por uma via independente de IP<sub>3</sub>Rs.

A capacidade contrátil do miocárdio pode ser alterada por um dos três seguintes modos: 1) pela variação da quantidade de Ca<sup>2+</sup> disponível para ativar os miofilamentos, 2) pela alteração da afinidade de ligação do filamento ao Ca<sup>2+</sup> e, 3) pela alteração da cinética dos filamentos quando da ligação do Ca<sup>2+</sup> (Ford, 1991). Experimentos realizados através da técnica de permeabilização da membrana (*"skinned fibers"*) possibilitam que as propriedades mecânicas das proteínas contráteis sejam investigadas sem que haja interferência dos mecanismos do processo de AEC. Estudos em fibras permeabilizadas provêm informações sobre as propriedades mecânicas ativas e passivas do aparato miofibrilar (Matsubara et al., 1989).

Os experimentos com fibras permeabilizadas, portanto, na ausência de estimulação elétrica, permitem a análise das propriedades do ciclo de pontes



transversas haja vista que a produção da força observada é determinada pela maior concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Por outro lado, esta preparação também possibilita determinar a capacidade do RS em liberar íons  $\text{Ca}^{2+}$  mediante a presença de cafeína, um conhecido agonista de RyRs (Vites e Pappano, 1994).

A sensibilidade do aparato contrátil aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser determinada quando da utilização da Solução A (pCa 4,0). Os resultados aí obtidos nos indicam a capacidade máxima de produção de força em consequência da máxima concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na solução. Estes resultados, corrigidos em percentual, foram considerados como padrão para comparação com a produção de força induzida por outros agentes. (Lofrano-Alves, M.S., et al.; 2005).

Quando a preparação atrial foi transferida para a Solução E acrescida de cafeína (30mM) pudemos observar uma produção de força, ocorrida devido a ação desse agente sobre os RyRs com conseqüente liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tais resultados, corroboram os encontrados em experimentos com músculo esquelético de crustáceos (Lea, J. T., 1996). Da mesma forma, esses dados nos confirmam a viabilidade da membrana do RS mesmo após a saponificação.

Logo após, a preparação foi transferida para a Solução L objetivando um recarregamento do RS com íons  $\text{Ca}^{2+}$ , a preparação foi transferida desta feita, para a Solução E acrescida de eugenol (5mM). Os resultados indicam que o eugenol foi capaz de induzir um desenvolvimento de força significativamente superior quando comparada àquela induzida pela cafeína (agonista de RyRs). Considerando-se, como visto anteriormente, a possibilidade do eugenol não estar atuando via RyRs, poderíamos hipotetizar que a força desenvolvida foi, possivelmente, induzida por uma via independente dos RyRs. Tais dados confirmam os encontrados em experimentos com músculo intacto.

Considerando o fato de que os miócitos atriais expressam  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (tipo 2) em quantidade 6 a 10 vezes superior aos miócitos ventriculares e que, os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  estão co-localizados com os RyRs no espaço subsarcolemal (Lipp et al., 2000; Mackenzie et al., 2002; Wang et al., 2005); avaliamos agora o possível envolvimento do eugenol na via  $\text{IP}_3\text{Rs}$ . As mesmas etapas iniciais foram repetidas aqui, contudo, logo após a preparação ter sido recarregada com íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Solução L), a mesma foi transferida para a Solução E acrescida de eugenol (5 mM) e 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ). Tais resultados, nos sugerem que em preparações de fibras permeabilizadas por saponina e tratada com 2-APB, o eugenol foi capaz de induzir uma contração com diferença significativa

quando comparada àquela desenvolvida pela cafeína (30 mM), entretanto, sem diferença significativa quanto com controle (eugenol 5 mM).

É relatado na literatura, que resultados obtidos usando fibras permeabilizadas, membranas celulares, e fibras intactas sugerem que o 2-APB não pode ser considerado um bloqueador consistente de IP<sub>3</sub>Rs (Maruyama et al., 1997; Missiaen et al., 2001; Gregory et al., 2001; Bootman et al., 2002).

Através do uso de saponina para a permeabilização da membrana, pode-se criar poros, uma vez que este composto atua especificamente nos colesteróis de membrana dissolvendo-os. Assim, esta técnica possibilita a utilização de agentes com elevado peso molecular, como é o caso da heparina (Zima & Blatter., 2004). A heparina é considerada um bloqueador específico de IP<sub>3</sub>Rs (Maruyama, T. et al., 1997; Bootman, M. D. et al., 2002), apresentando uma ação mais eficiente que o 2-APB (Kobayashi et al., 1988). As mesmas etapas iniciais foram repetidas aqui, contudo, logo após a preparação ter sido recarregada com íons Ca<sup>2+</sup> (Solução L), a mesma foi transferida, por 15 minutos, para a Solução E acrescida de heparina (5 mg/ml). Em seguida, a preparação foi transferida para outro “troff” contendo Solução E agora acrescida de heparina (5 mg/ml) e eugenol (5 mM). Tais resultados sugerem que em preparações de fibras permeabilizadas por saponina e tratada com heparina, o eugenol foi capaz de induzir uma contração significativamente maior quando comparada àquela desenvolvida por cafeína (30 mM), porém, com amplitude de força significativamente menor àquela desenvolvida pelo controle (eugenol 5 mM). Frente a tais resultados, podemos hipotetizar que o eugenol poderia estar apresentando uma ação sobre os IP<sub>3</sub>Rs, mas, certamente, também estaria apresentando uma via de ação independente de IP<sub>3</sub>Rs.

Por outro lado, quando as mesmas etapas iniciais foram repetidas em outro grupo experimental onde as preparações, logo após terem sido recarregadas com íons Ca<sup>2+</sup> (Solução L), foram transferidas, por 15 minutos, para a Solução E acrescida de heparina (5 mg/ml), o bloqueador específico de IP<sub>3</sub>Rs, mais a procaína (10 mM), o bloqueador não específico de RyRs. Em seguida, a preparação foi transferida para outro “troff” contendo Solução E agora acrescida de heparina (5 mg/ml) mais procaína (10 mM) e eugenol (5 mM). Os resultados sugerem que em preparações de fibras permeabilizadas por saponina e tratada com heparina mais procaína, o eugenol foi capaz de induzir uma contração significativamente maior quando comparada àquela desenvolvida por cafeína (30 mM). Ao compararmos a

amplitude da força de contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial tratado com heparina mais procaína àquela desenvolvida quando sob condição controle (eugenol, 5 mM) observamos que a amplitude de força desenvolvida foi significativamente menor àquela desenvolvida pelo controle (eugenol 5 mM). Contudo, a presença de procaína (10 mM) não alterou a amplitude da força da contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial quando comparada àquela desenvolvida sob tratamento somente com heparina (5 mg/ml). Assim, mais uma vez, os resultados sugerem que o eugenol poderia estar apresentando uma ação via os IP<sub>3</sub>Rs, mas também, estaria agindo por uma via independente tanto de RyRs como de IP<sub>3</sub>Rs.

A fluorimetria de tecidos biológicos para medir a concentração do cálcio citosólico [Ca]<sub>i</sub> tem sido grandemente facilitada pela introdução de marcadores fluorescentes com maior eficiência bem como pelo desenvolvimento de técnicas simples para a introdução dos diferentes marcadores no citosol (Grynkiewicz et al., 1985; Lorell et al., 1990; Del Nido et al., 1998). Assim, músculos tratados com substâncias que emitem fluorescência (aequorina; indo1 e fura 2) ao se combinarem com o cálcio ionizado demonstra-se um aumento intracelular de cálcio durante a despolarização pelo aumento da fluorescência. Este cálcio aumentado no citosol irá, então, atuar sobre a troponina-C e disparar o mecanismo de contração muscular (Lorell et al., 1990). Podemos, desde já, deduzir que ao interferirmos sobre o mecanismo de AEC, estaremos interferindo na contração muscular via íons cálcio. Assim sendo, autores puderam concluir que o cálcio está compartimentalizado em uma série de sítios localizados dentro e fora da célula, tais como: cálcio extracelular; cálcio ligado aos sítios aniônicos do glicocálice; cálcio via corrente lenta (DHPRs); cálcio ligado à face interna da membrana; cálcio ligado ao RS; cálcio mioplasmático que atua sobre a troponina; cálcio mitocondrial e cálcio nuclear. O ruthenium red é um composto solúvel em água obtido através da reação em solução de RuCl<sub>3</sub> e NH<sub>3</sub> (Joly, 1892). Ele é um composto complexo de relativo elevado peso molecular e, assim, impermeável à membrana (Charuk et al., 1990). Assim, o ruthenium red é um composto largamente utilizado em preparações de fibras permeabilizadas por saponina pois atua como um agente bloqueador específico de RyRs (Kargacin et al., 1998; Marx et al., 2001). Ruthenium Red tem efeito do tipo inibitório em relação ao transporte e liberação de Ca<sup>2+</sup> de estoques mitocôndriais (Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R., 1990), é um potente inibidor dos canais liberadores de Ca<sup>2+</sup> do RS em

músculo liso e músculo esquelético (Garcha, R. S., and Hughes A. D., 1994; Kanmura, Y, et al., 1989; Chamberlain, B. K., et al., 1984; Ma, J., 1993; Mack, M.M., et al., 1992); a Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (PMCA) (Missiaen et al., 1990; a Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana do RS (SERCA) (Kanmura et al., 1989); a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{InsP}_3$  (portanto, inibe  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) (Kanmura et al., 1989; Vites & Pappano, 1994), bem como várias proteínas de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ : calmodulina (Sasaki et al., 1992), calsequestrina (Charuk et al., 1990). Assim sendo, elaboramos protocolo no qual todas as etapas iniciais dos protocolos anteriores foram repetidas e, logo após a preparação ter sido recarregada com íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Solução L), a mesma foi transferida, por 15 minutos, para a Solução E acrescida de ruthenium red (10  $\mu\text{M}$ ). Após período de incubação com ruthenium red observamos que este composto foi capaz de desenvolver força transiente por promover a dissociação do  $\text{Ca}^{2+}$  do seu sítio de ligação (Corbalan-Garcia et al., 1992). Sendo assim, para efeito de análise, foi subtraído da força total produzida pelo eugenol na fibra tratada com ruthenium red, o valor da contração transiente desenvolvida pelo ruthenium red. Em seguida, a preparação foi transferida para outro “troff” contendo Solução E agora acrescida de ruthenium red (10  $\mu\text{M}$ ) mais e eugenol (5 mM). Os resultados sugerem que em preparações de fibras permeabilizadas por saponina e tratada com ruthenium red, o eugenol foi capaz de induzir uma contração significativamente maior àquela desenvolvida por cafeína (30 mM) porém, a amplitude da força da contração desenvolvida é estatisticamente igual àquela desenvolvida pelo eugenol na condição controle (eugenol 5 mM). Dessa forma, nossos resultados sugerem que o eugenol poderia estar agindo por uma via independente a descrita no processo de CICR. Estes dados corroboram com os encontrados tanto nos experimentos com músculo de músculos atriais intactos como àqueles encontrados nos experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com bloqueadores dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$ .

O complexo regulatório troponina/tropomiosina do filamento regulatório do filamento contrátil fino inibi fortemente o sítio de ligação da miosina à actina quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a valores inferiores a  $\sim 10^{-7}$  M no músculo esquelético e/ou cardíaco. Todavia, quando ocorre a subsequente liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dos estoques intracelulares (RS) para o citosol, o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga aos sítios regulatórios de baixa afinidade (I e II) da troponina nos músculos esquelético, sTnC,

e cardíaco, cTnC, dando início a uma cascata de interações entre as proteínas regulatórias do filamento fino, a qual ativa ou induz alteração conformacional levando a um estado de ativado (“on”), possibilitando que as pontes cruzadas do filamento de miosina se liguem fortemente à actina gerando, em consequência, força (Farah & Reinach, 1995; Horowitz et al., 1996; Nomura et al., 2000). Apesar da ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à TnC seja importante para o início do processo de contração, existe evidência de que a forte ligação da miosina à actina também desempenha um efetivo papel na ativação do filamento fino. Por exemplo: a ligação da miosina aos filamentos finos no “estado de rigor mortis” aumenta a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  aos filamentos finos tanto em experimentos “*in vitro*” (Bremel & Weber, 1975) quanto em experimentos com fibras esqueléticas permeabilizadas (Fuchs, 1977). O BDM apresenta um efeito inotrópico negativo tanto sobre músculo cardíaco intacto quanto sobre o permeabilizado (Li et al., 1985; Daly et al., 1987). Este composto não apresenta nenhum efeito maior tanto sobre a atividade elétrica do coração quanto sobre a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (Mulieri & Alpert, 1984; Li et al., 1985). O BDM reduz a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , deslocando a curva de sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  para a direita (Li et al., 1985). Ele também inibe a formação das pontes cruzadas (Mulieri & Alpert, 1984; Blanchard et al., 1984). Assim sendo, as miofibrilas parecem ser o principal sítio de ativação do BDM. Por outro lado, a ação do BDM é dependente da concentração (Tripathy et al., 1999); visto que em baixas concentrações (<2 mM) reduz a força através da redução do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente enquanto que em altas concentrações (10 e 30 mM) ele também afeta a ciclicização das pontes cruzadas, inibindo-as, por manter estabilizado o estado AM.ADP.Pi (Herrmann et al., 1992; Fryer et al., 1988), bem como diminui a sensibilidade das miofibrilas ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Em nossos experimentos, utilizamos BDM em concentrações de 10 mM e 30 mM. Nossos resultados mostraram que quando a fibra muscular atrial foi tratada com BDM (10 mM) mais eugenol (5 mM), obtivemos uma redução significativa da amplitude de força de contração em comparação àquela desenvolvida pela condição controle (eugenol 5 mM). Contudo, quando a fibra muscular atrial foi tratada com BDM (30 mM) mais eugenol (5 mM), observamos que o eugenol foi incapaz de induzir contração. Esses resultados, nos possibilita hipotetizar que o BDM em altas concentrações (30 mM) foi capaz inibir a ciclicização das pontes cruzadas (Fryer, et al., 1988; Blanchard et al., 1990; Maylie & Hui, 1991; Herrmann, et al., 1992; Kagawa, et al., 1995) e, conseqüentemente, o eugenol,

nestas condições experimentais, foi incapaz de produzir contração atrial. Assim sendo, nossos resultados em preparações com utilização do BDM sugerem que este composto ao induzir o completo relaxamento da trabécula atrial, sugere que a ação do eugenol seria, possivelmente, resultado de um estado ativo de ciclização de pontes cruzadas, e não de um estado de “*rigor mortis*”.

Estudos em células isoladas de músculo esquelético e de músculo cardíaco dos quais o sarcolema foi removido mecanicamente (skinned fibers) tem favorecido estudos sobre os processos de ativação do sistema contrátil (Gordon, 1978). A remoção do sarcolema favorece grandemente a acessibilidade dos filamentos contráteis às soluções contendo íons e substratos. Dessa forma, os efeitos dos íons e substratos sobre os registros da tensão muscular de fibras desmembranadas pode ser utilizado para avaliar suas interações com as proteínas contráteis (Gordon, 1978). A solubilização da bicamada lipídica por meio de diferentes detergentes não-iônicos tem chamado a atenção, particularmente pelo uso do Triton X-100 (Almgren, 2000). A utilização do Triton X-100 tem sido empregada objetivando a permeabilização tanto da membrana celular (sarcolema) bem como da membrana das organelas. Tal procedimento nos possibilita estudo mais direto sobre as proteínas contráteis (Almgren, 2000). As mesmas etapas desenvolvidas nos primeiros protocolos experimentais com fibras permeabilizadas e descritos anteriormente foram repetidas aqui, contudo, logo após a preparação ter desenvolvido força induzida pelo eugenol (5 mM) ela foi transferida para outro “*troff*” contendo a Solução E acrescida de eugenol (5 mM) e Triton X-100 (1% , vol/vol). Nossos resultados mostraram que quando a preparação foi mergulhada nessa solução, observamos que além do eugenol ter sido incapaz de induzir contração na trabécula atrial esta, por sua vez, apresentou um relaxamento com tensão de repouso inferior à condição inicial. Tais resultados sugerem que o eugenol não estaria agindo diretamente sobre as proteínas contráteis.

Na técnica de fibra permeabilizada, podemos utilizar soluções com diferentes concentrações de EGTA, um conhecido quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  (Godt & Maughan, 1977). Em nossos protocolos experimentais, utilizamos a Solução E a qual contém 0,5 M de EGTA, portanto, baixa capacidade para quelar  $\text{Ca}^{2+}$ ; bem como a Solução R a qual contém 5 mM de EGTA, portanto, alta capacidade para quelar  $\text{Ca}^{2+}$  ((Godt & Maughan, 1977; (Godt & Maughan, 1981). Inicialmente, a preparação após ter sido permeabilizada por saponina, foi transferida para um “*troff*” contendo Solução A (pCa

4,0). Nessas condições observamos o desenvolvimento da amplitude máxima da contração desenvolvida pelas trabéculas atriais. Em seguida, a preparação foi transferida para outro “*troff*” contendo Solução R (alto EGTA). Nestas condições, observamos que a preparação relaxou completamente, o que sugere ter ocorrido satisfatoriamente a ação quelante do EGTA. De imediato, a preparação foi transferida para outro “*troff*” contendo Solução R (alto EGTA) mais cafeína (30 mM). Nesse momento, pudemos observar a completa ausência de resposta contrátil, fato esse que confirma a concentração de 5 mM de EGTA seria suficiente para quelar todo o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo RS via RyRs. Em seguida, após ter passado pela Solução R (relaxante) a preparação foi transferida para outro “*troff*” contendo Solução R (alto EGTA) mais eugenol (5 mM). Tal procedimento nos mostrou que o eugenol foi capaz de induzir o desenvolvimento de contração mesmo em solução com EGTA (5 mM). Esses resultados nos sugerem, pois, que o eugenol estaria, possivelmente induzindo contração nas preparações atriais através de uma via independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante tais resultados, procedemos, em seguida, a permeabilização dessa mesma preparação com Triton X-100. Assim sendo, obtivemos uma preparação onde seria viável determinar se o composto em estudo (eugenol) estaria ou não atuando diretamente sobre os miofilamentos contráteis. Ao final dessa etapa, podemos observar que o eugenol não foi capaz de induzir desenvolvimento de força de contração como observado em protocolos anteriores. Ainda nesse protocolo, a preparação foi recolocado em “*troff*” contendo Solução A (pCa 4,0). O resultado nos mostrou que as trabéculas atriais foram capazes de desenvolver força de contração sugerindo, pois, que o Triton X-100 não foi capaz, nessas condições experimentais, de alterar a capacidade de ciclicização dos filamentos contráteis.

## CONCLUSÕES

A técnica de estimulação elétrica indireta nos permitiu realizar experimentos com preparações musculares atriais intactas. Dessa forma, esta técnica nos possibilitou analisar os possíveis efeitos do eugenol sobre o processo de acoplamento excitação-contração (AEC) de miócitos atriais.

Os resultados observados nestas preparações sugerem que os efeitos do eugenol sobre o AEC são concentração-dependentes e, que em altas concentrações, este composto é capaz tanto de abolir o abalo muscular quanto de induzir um aumento da tensão de repouso do músculo atrial. Bloqueadores específicos e não específicos dos RyRs não foram capazes de alterar desenvolvimento de contração (elevação da linha de tensão de repouso) induzida pelo eugenol. Assim, tais resultados indicam que a via pela qual este composto estaria agindo seria independente dos RyRs. Entretanto quando da realização de experimentos com bloqueador não específico de  $IP_3$ Rs (2-APB), observamos uma redução significativa na capacidade do eugenol em desenvolver força. Entretanto, tal inibição foi apenas parcial, indicando que possivelmente a via de ação do eugenol poderia ser pelos  $IP_3$ Rs, porém, possivelmente, uma outra via também estaria envolvida.

Com a técnica de fibras permeabilizadas foi possível utilizarmos a Heparina, um bloqueador específico de  $IP_3$ Rs. A heparina foi capaz de reduzir significativamente a capacidade do eugenol em desenvolver força. Tal resultado sugere que, possivelmente, a via de ação do eugenol é por  $IP_3$ Rs. Contudo, esta redução na capacidade do eugenol em induzir força, foi apenas parcial indicando portanto, que eugenol poderia também estar agindo através de uma segunda via de ação.

O desenvolvimento de força induzida pelo eugenol não é conseqüente a um estado de “*rigor mortis*” visto que tanto nos protocolos de fibras permeabilizadas por saponina onde utilizamos o BDM bem como, nos protocolos onde a permeabilização foi realizada com Triton X-100, o eugenol foi incapaz de induzir força. Desta forma, tais resultados sugerem que além do fato da ação deste composto não se caracterizar como um estado de “*rigor mortis*”, possivelmente, sua via de ação não



seria diretamente sobre as proteínas contráteis. Assim, poderíamos hipotetizar que a ação do eugenol poderia ser via  $IP_3Rs$  e, possivelmente, por mais uma outra via.

Nas preparações atriais permeabilizadas por saponina e na presença de alta concentração de EGTA, o eugenol foi capaz de induzir desenvolvimento de força, sugerindo que a via, independente de  $IP_3Rs$ , pela qual o eugenol estaria agindo, seria possivelmente, independente de  $Ca^{2+}$ .

Tais resultados tomados em conjunto, nos sugerem que o eugenol seria, provavelmente, um agonista de  $IP_3Rs$ , e assim, induzindo a liberação de  $Ca^{2+}$  a partir do RS. Entretanto, o eugenol, possuiria ainda, uma segunda via de ação, desconhecida, independente de  $Ca^{2+}$ , e possivelmente com uma capacidade de ativação das proteínas contráteis superior àquela observada pela via  $IP_3Rs$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlijamian MK; Westenbroek RE; Catterall WA. Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron*. 1990; 4: 819–32.
- Aires, MM. *Fisiologia Humana*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 795p.
- Almers, W., Stirling, C.. Distribution of transport proteins over animal cell membranes. *J. Memb. Biol*, 1984; 77: 169-186
- Almgren, M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants, *Bioch. et Bioph. Acta*, 2000; 1508:146-163.
- Andrews MAV et al., Ion specific and general ionic effects on contraction of skinned fast-twitch skeletal muscle from the rabbit. *J. of Gen. Phy.*, 1991; 98: 1105-1125.
- Ascher-Landsberg, J; Saunders, T; Elovitz, M; Phillipe, M; The effects of 2-aminoethoxydiphenyl borate, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulator on myometrial contractions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 264:979–982.
- Bangalore, R., Mehrke, G., Gingrich, K., Hofmann, F., Kass, R.S. Influence of L-type Ca channel  $\alpha 2/\delta$ -subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am. J. Physiol*, 1996; 270: H1521-H1528.
- Bennett, PB. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Hist. and Cytoch.*, 1963; 11: 14.
- Berlin, J.R. Spatiotemporal changes of  $\text{Ca}^{2+}$  during electrically evoked contractions in atrial and ventricular cells. *Am J Physiol*, 1995; 269:H1165-H1170.
- Bers, DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002; 45:198-205.

- Bers, DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2<sup>st</sup> ed. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2001.
- Bers, DM; Stiffel, VM. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *American Journal of Physiology*, 1993; 264: C1587-C1593.
- Bezprozvanny, I and Ehrlich, BE. The inositol 1, 4, 5-trisphosphate (InsP) receptor. *J Membr Biol*, 1995; 145:205-216.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., Ehrlich, B.E.. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 1991; 351:751,754.
- Blanchard, EM; Smith, GL; Allen, DG; Alpert, NR; The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillae muscles. *Pflug Arch Eur J*, 1990; 416:219-221.
- Blanchard, EM; Solaro, RJ; Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH. *Circ Res*, 1984; 55:382-391.
- Block, BA; Imagawa, T; Campbell, KP; Franzini-Armstrong, C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *Journal of Cellular Biology*, 1988; 107: 2587-2600.
- Blondel, O; Takeda, J; Jansen, H; Seino, S and Bell, GI. Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP<sub>3</sub>R-3, expressed in pancreatic islet, kidney, gastrointestinal tract and other tissues. *J Biol Chem*, 1993; 268:11356-11363.
- Bodi, I; Mikala, G; Koch, SE; Akhter, AS; Schwartz, A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005; 115.

- Boehning D; Mak DOD; Foskett JK; Joseph SK; Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channels. J Biol Chem, 200; 1276: 13509–13512.
- Bootman, M.D.; Lipp, P & Berridge, M.J. The organization and functions of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals. J Cell Sci, 2001; 114:2213-2222.
- Bootman, MD; Collins, TJ; Mackenzie, L; Roderick, HL; Berridge, MJ; Peppiatt, CM;. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry, but an inconsistent inhibitor of  $\text{InsP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, FASEB J., 2002; 16:1145–1150.
- Bremel, RD & Weber, A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. Biochemistry Biophysics Acta, 1975; 376: 366-374.
- Brenner, B. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibres. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1988; 85: 3265-33269.
- Brenner, B; Yu, LC; Structural changes in the actomyosin cross-bridges associated with force generation. Proc Natl Acad Sci (USA), 1993; 90:5252-5256.
- Bridge, J.H.B., Smolley, J.R., Spitzer, K.W.. Isolation of the sodium-calcium exchange current underlying sodium-dependente relaxation in heart muscle. Science, 1990; 248: 376-378.
- Brilla C; Janicki JS; Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. Circulation Research, 1991; 69: 107-115.
- Brodin, P & Roed, A. Effects of eugenol on rat phrenic nerve and phrenic nerve-diaphragm preparations. Archives of Oral Biology, 1984; 29(8): 611-615.

- Brown, J.H., Jones, L.G.. Phosphoinositide metabolism in the heart, in Phosphoinositides and receptor mechanisms. Putney, J.W. Jr (ed). New York, NY, 1986; 245-270.
- Burgess, G.M., Bird, G.S., Obie, J.F., Putney, J.W Jr.. The mechanism for synergism between phospholipa. J. Biol. Chem., 1991; 266: 4772-4781.
- Cameron, AM; Steiner, JP; Sabatini, DM; Kaplin, AL; Walensky, LD; Snyder, SH. Immunophilin FK506 protein associated with inositol 1,4,5-triphosphate receptor modulates calcium fluz. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995; 92:1784-1788.
- Carl, S.L.; Felix, K.; Caswell, A.H.; Brandt, N.R.; Ball, W.J.Jr; Vaghy,P.L.; Meissner, G. & Ferguson, D.G. Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticulum triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. J Cell Biol, 1995; 129:672-682.
- Caroni P & Carafoli, E. An ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping system in dog heart sarcolemma. Nature, 1980; 283: 765-767.
- Chadwick, CC; Saito, A and Fleischer, S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87:2132-2136.
- Chamberlain BK, Volpe P, Fleischer S. Inhibition of calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. J Biol Chem, 1984; 259:7547–7553
- Chamberlain, BK; Volpe, P; Fleischer S. Inhibition of calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. J Biol Chem, 1984; 259:7547–7553.
- Chapman, RA. Control of cardiac contractility at the cellular level. American Journal of Physiology. Heart Circ Physiol, 1983; 14: H535-H552.

- Charuk, JHM; Pirraglia, CA; Reithemeier, RAF. Interaction of ruthenium red with  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins. *Analytical Biochemis*, 1990; 188:123-131.
- Cheng, H; Lederer, WJ; Cannell, MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitatio-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 1993; 262: 740-744.
- Cingolani, HE; Houssay, AB. *Fisiologia Humana de Houssay*. 7<sup>a</sup>. edição. São Paulo: editora Artmed, 2004.
- Clapham, DE. Calcium signaling. *Cell*, 1995; 80: 259-268.
- Constantin, LL & Podolsky, RJ. Apud Fabiato, A & Fabiato, F. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*, 1977; 40: 119-129.
- Corbalan-Garcia, S.; Teruel, A; Gomez-Fernandez, J.C. Characterization of Ruthenium Red-binding sites of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from sarcoplasmic reticulum and their interaction with  $\text{Ca}^{2+}$ -Binding sites. *Murcia: J. Biochem*, 1992; 287, 767-774
- Craveiro, AA; Rodrigues, AS; Andrade, CHS. Volatile constituents of brazilian Euphorbiaceae genus Croton. *J Nat Prod*, 1981; 44(5): 509-632.
- Curry, FE. Determinants of capillary permeability: a review of mechanisms based on single capillary studies in the frog. *Circ Res*, 1986; 59: 367-380.
- Daly, MJ; Elz, JS; Nayler, WG. Contracture and the calcium paradox in the rat heart. *Circ Res*, 1987; 61:560-569.
- Damiani, CEN; Moreira, CM; Zhang, HT; Creazzo, TL and Vassallo, DV. Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle. *J Card Pharmacol*, 2004; 44:688-695.
- De Jongh, KS; Merrick, DK; Catterall, WA. Subunits of purified calcium channels. A 212-kDa form of  $\alpha_1$  and partial amino acid sequence of a phosphorylation site of

an independent  $\beta$  subunit. *Proc of the Nat Acad of Sci, USA*, 1989; 86: 8585-8589.

De Waard, LJ; Pragnell, M; Campbell, KP.  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron*, 1994; 13:495-503.

Del Nido, PJ; Glynn, P; Buenaventura, P; Salama, G; Koretsky, AP. Fluorescence measurement of calcium transients in perfused rabbit heart using rhod 2. *The Am Physiol Society*, 1998; 43:728-741.

Del Valle-Rodriguez, A; Lopez-Barneo, J; Urena, J.  $\text{Ca}^{2+}$  channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *EMBO J.*, 2003; 22:1–9.

Ducke, A. Estudos botânicos no Ceará. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1959; 31: 231.

Dulhunty AF. Excitation–contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin and Exp Pharmacol and Physiol*, 2006; 33, 763–772.

Elison, C.; Jenden, D.J. Effects of Ryanodine on Model Systems Derived from Muscle. *Bioch Pharmacol*, 1967; 16:1339.

Endo, M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev*, 1977; 57: 71-108.

Endo, M. Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Proc. Jpn. Acad*, 1975; 51, 479–484.

Endoh, M. Cardiac  $\alpha_1$ -adrenoceptors that regulate contractile function: Subtypes and subcellular signal transduction mechanisms. *Neuroch Res*, 1996; 21: 217-229.

Ertl, R; Jahnel, U; Nawrath, H; Carmeliet, E; Vereecke, J; Differential electrophysiologic and inotropic effects of phenylephrine in atrial and ventricular

heart muscle preparations from rats. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1991; 344:574-581.

Fabiato, A & Fabiato, F. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J of Physiol, 1983; 245: c14.

Fabiato, A. & Fabiato, F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. J Physiol, London, 1975; 249: 469-495.

Fabiato, A. Comparison and relation between inositol (1, 4, 5)-trisphosphate-induced release and calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum, in Recent Advances in Calcium Channels and Calcium Antagonists. Yamada K; Shibata S (eds). Elmsford, NY, Pergamon Press, Inc. 1990; 35-39.

Fabiato, A. Dependence of the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced release from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres from the frog semitendinosus on the rate of change of free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration at the outer surface of the sarcoplasmic reticulum. J Physiol, 1984; 353-56.

Fabiato, A. Inositol (1, 4, 5)-trisphosphate-induced release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. Biophys J, 1986a; 49:190a.

Fabiato, A. Inositol (1, 4, 5)-trisphosphate-induced versus  $\text{Ca}^{2+}$  from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Proc Int Union Physiol Sci, 1986b; 16:350.

Fabiato, A. Rapid ionic modifications during the aequorin-detected calcium transient in a skinned canine cardiac Purkinje cell. J Gen Physiol, 1985; 85:189-246.

Fabiato, A & Fabiato, F. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum Circ Res, 1977; 40: 119-129.

Fairhurst, A.S. Effect of Ryanodine on Skeletal-Muscle Reticulum Calcium Adenosine-Triphosphatase. Biochem Pharmacol, 1973; 22:2815-2827.



- Farah, CS; Reinach, FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB. J.*, 1995; 9:755–767.
- Ferrier, G.R.; Howlett, S.E. Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction. *American Journal of Physiology-Heart and Circ Physiol*, 2001; 280:H1928-H1944.
- Flicker, PF; Phillips GN Jr; Cohen, C. Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J Mol Biol*, 1982; 162: 495-501.
- Ford, L.E. Mechanical Manifestations of Activation in Cardiac-Muscle. *Circ Res*, 1991; 68:621-637.
- Franzini-Armstrong, C. Membrane particles and transmission at the triad. *Fed Proc*, 1975; 34: 1382-1389.
- Franzini-Armstrong, C. Studies of the triad. Structure of the junction in frog twitch fibres. *J Cell Biol*, 1970; 47: 488-499.
- Franzini-Armstrong, C; Protasi, F. Ryanodine receptors of striated muscles: A complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev*, 1997; 77: 699-729.
- Freiburg, A; Gautel, M;. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Biochem*, 1996; 235:317-323.
- Fryer, MW; Neering, IR; Stephenson, DG. Effects of 2,3-butanedione monoxime on the contractile activation properties of fast- and slow-twitch rat muscle fibres. *J. Physiol*, 1988; 407:53–75.
- Fuchs, F. The binding of calcium to glycerinated muscle fibers in rigor. The effect of filament overlap. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1977; 491:523–531.

- Furuichi, T; Yoshikawa, S; Miyawaki, A; Wada, K; Maeda, N and Mikoshiba, K. Primary structure and functional expression of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature*, 1989; 342:32-38.
- Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF & Pessah IN. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron*, 1997; 19:723–733.
- Galvan, DL; Borrego-Diaz, E; Perez, PJ; Mignery, GA;. Subunit oligomerization, and topology of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *J. Biol. Chem*, 1999; 274:29483-29492.
- Gambassi, G., Spurgeon, H. A., Ziman, B. D., Lakatta, E. G. & Capogrossi, M. C. Opposing effects of  $\alpha$ 1-adrenergic receptor subtypes on  $\text{Ca}^{2+}$  and pH homeostasis in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol*, 1998; 274, H1152–H1162.
- Garcha RS; Hughes AD. Action of heparin and ruthenium red on responses of reversibly-permeabilized rat mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol*, 1994; 268:319–325.
- Gautel, M; Goulding, D; A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Lett*, 1996; 385:11-14.
- Go, LO; Moschella, MC; Watras, J; Handa, KK; Fyfe, BS and Marks, AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest*, 1995; 95:888-894.
- Godt RE & Lindley BD. Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog. *J Gen Physiol*, 1982; 80: 279-297.
- Godt RE; Fogaça RTH et al., Changes in force and calcium sensitivity in the developing avian heart. *Can J Physiol and Pharmacol*, 1991; 69: 1692-1697.

- Godt, RE; Maughan, DW. Influence of osmotic compression on calcium activation and tension in skinned muscle fibers of the rabbit. *Pflug. Arch.*, 1981; 391:334-337.
- Godt, RE; Maughan, DW. Swelling of skinned muscle fibers of the frog, experimental observations. *Biophys. J.*, 1977; 19:103-116.
- Gordon, AM; Huxley, AF; Julian, FJ. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol*, 1966; 184: 170-192.
- Gordon, AR. Contraction of Detergent-treated smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1978; 75:3527-3530.
- Gregory, RB; Rychkov, G; Barritt, GJ; Evidence that 2-aminoethoxydiphenyl borate is a novel inhibitor of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors, *Biochem. J.*, 2001; 354:285–290.
- Grynkiewicz, G; Poenie, M; Tsien, RY. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985; 260:3440-3450.
- Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 1990; 258:C755–C786
- Györk, S; Fill, M. Ryanodine receptor adaptation: Control mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in heart. *Science*, 1993; 260:807-809.
- Hackett, PH; Rodriguez, G; Roach, RC. Clove cigarettes and high-altitude pulmonary edema. [Letter] *JAMA*, 1985; 253: 3551-3552.
- Hagan, EC; Jenner, PM; Jones, WI. Toxic properties of compounds related to safrole. *Toxicol and Appl Pharmacol*, 1965; 7: 18-24.

- Hagar, RE; Ehrkucg, BE; Regulation of the type III InsP<sub>3</sub> receptor by InsP<sub>3</sub> and ATP. *Biophys J.*, 2000; 79:271-278.
- Han H-M, Robinson RB, Bilezikian JP & Steinberg SF. Developmental changes in guanine nucleotide regulatory proteins in the rat myocardial  $\alpha$ 1-adrenergic receptor complex. *Circulation Res*, 1989; 65:1763–1773.
- Hancock, WO; Martyn, DA; Huntsman, LL. Ca<sup>2+</sup> and segment length dependence of isometric force kinetics in intact ferret cardiac muscle. *Circulation Res*, 1993; 603-611.
- Hartmann, HA; Mazzocca, NJ; Kleiman RB; Houser, SR. Effects of phenylephrine on calcium current and contractility of feline ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1988; 255: H1173-H1180.
- Herrmann, C.; Wray, J.; Travers, F. & Barman, T. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPase. An exemple of an uncompetitive inhibitor. *Biochem*, 1992; 31, 12227-12232,.
- Hescheler, J; Nawrath, H; Tang, M; Tratwein, W. Adrenoceptor-mediated changes of excitation and contraction in ventricular heart muscle from guinea-pigs and rabbits. *J Physiol*, 1988; 397: 657-670.
- Higuchi, H. & Takemori, S. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *The J Biochem*, 1989; 105, 638-643,.
- Hirata, M; Suematsu, E; Hashimoto, T; Hamachi, T and Koga, T; Release of Ca<sup>2+</sup> from non-mitochondrial store in peritoneal macrophages treated with saponin by inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Biochem J*, 1984; 223:229-236.
- Hirs, A. Sales of clove cigarettes in US: health questions emerge. *Tabacco International*, 1984; 28: 57-58.

- Holroyde, MJ; Robertson, SP; Johnson, JD et al., The calcium and magnesium binding sites on cardiac troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphate. *J Biol Chem*, 1980; 255: 11668-11693.
- Horowitz, A; Menice, CB; Laporte, R and Morgan, K. Mechanism of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*, 1996; 76:967-1003.
- Hui, C. S. Pharmacological studies of charge movement in frog skeletal muscle. *J Physiol*, 1983; 337:509-529.
- Hüser J; Lipsius SL & Blatter LA. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J Physiol*, 1996; 494:641-651.
- Inui, M; Saito, A; Fleischer S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet tructures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J Biol Chemi*, 1987a; 262: 1740-1747.
- Inui, M; Saito, A; Fleischer, S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem*, 1987b; 262: 15637-15642.
- Ivanov, S.V., et al. Cerebellar ataxia, seizures, premature death, and cardiac abnormalities in mice with targeted disruption of the *Cacna2d2* gene. *Am. J. Pathol*, 2004; 165:1007–1018.
- Jahnel U, Duwe E, Pfennigsdorf S & Nawrath H. On the mechanism of action of phenylephrine in rat atrial heart muscle. *Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol*, 1994; 349:408–415.
- Jahnel U, Jakob H & Nawrath H. Electrophysiologic and inotropic effects of alpha-adrenoceptor stimulation in human isolated atrial heart muscle. *Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol*, 1992a; 346:82–87.

- Jahnel U, Nawrath H, Carmeliet E & Vereecke J. Depolarization-induced influx of sodium in response to phenylephrine in rat atrial heart muscle. *J Physiol* , 1991; 432:621–637.
- Jahnel U, Nawrath H, Shieh RC, Sharma VK, Williford DJ & Sheu SS. Modulation of cytosolic free calcium concentration by alpha 1-adrenoceptors in rat atrial cells. *Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol* , 1992b; 346:88–93.
- Jenden, DJ; Fairhurst, AS; The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol Rev*, 1969; 21:1-25.
- Joly, A. Compose's ammoniacaux de'rive's du sesquichlorure de ruthe'nium. *C R Acad Sci*, 1892; 115:1299–1301.
- Jonas, S., Sugimori, M., and Llinas, R. Is low molecular weight heparin a neuroprotectant? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997; 825:389–393
- Kagawa, K; Horiuti, K; Yamada, K. BDM compared with P(i) and low  $\text{Ca}^{2+}$  in the cross-bridge reaction initiated by flash photolysis of caged ATP. *Biophys. J*, 1995; 69:2590–2600.
- Kanmura Y; Raeymaekers L; Casteels R. Effects of doxorubicin and ruthenium red on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in skinned rabbit mesenteric smooth-muscle fibers. *Cell Calcium*, 1989; 10:433–439.
- Kargacin, G.J.; Ali, Z; Kargacin, M.E. (1998). Ruthenium red reduces the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* (1998) 436:338–342
- Katz, AM. A growth of ideas: Role of calcium as activator of cardiac contraction. *Card Res*, 2001; 52:8-13
- Katz, AM. Molecular basis of calcium channel blockade. *Am J Cardiol*, 1992; 69: 17E-22E.

- Katz, AM. Purification and properties of tropomyosin-containing protein fraction that sensitizes reconstituted actomyosin to calcium-binding agents. *J Biol Chem*, 1966b; 241: 1522-1529.
- Katz, AM. Role of the contractile proteins and sarcoplasmic reticulum in the response of the heart to catecholamine: a historical review. *Adv Cyclic Nucleot Res*, 1979; 11: 303-343.
- Katz, AM; Repke, DI; Cohen, B. Control of the activity of highly purified cardiac actomyosin by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ , and  $\text{K}^{+}$ . *Circ Res*, 1966a; 19: 1062-1070.
- Katz, AM; Takenaka, H and Watras, J. The sarcoplasmic reticulum, in The heart and Cardiovascular System. Fozzard HA (ed). New York, NY, Raven Press, 1986; 731-746.
- Kentish, JC; Barsotti, RJ; Lea, TJ; Mulligan, IP; Patel, JR and Ferenczi, MA. Calcium release from sarcoplasmic reticulum induced by photorelease of calcium or  $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ . *Am J physiol*, 1990; 258:H610-H615.
- Keung EC & Karliner JS. Complex regulation of calcium current in cardiac cells; dependence on a pertussis toxinsensitive substrate, adenosine triphosphate, and an  $\alpha 1$ -adrenoceptor. *J Clin Invest*, 1990; 85:950–954.
- Kirsch, CM; Yenokida, GG; Jensen, WA; Wendland, R; Suh, H; Bourgault, M. Non-cardiogenic pulmonary edema due to the intravenous administration of clove oil. *Thorax*, 1990; 45: 235-236.
- Kobayashi, S., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. Heparin inhibits the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent, but not the independent, calcium release induced by guanine nucleotide in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1988; 153, 625–631.

- Kockskamper,J.; Sheehan,K.A.; Bare,D.J.; Lipsius,S.L.; Mignery,G.A.; Blatter,L.A. Activation and propagation of  $\text{Ca}^{2+}$  release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J*, 2001; 81:2590-2605.
- Komai H, Rusy BF. Effects of inhibition of trans-sarcolemmal calcium influx by nickel on force of postrest contraction and on contracture induced by rapid cool. *Cardiovasc Res*, 1993; 27:801–806.
- Kozam, G & Mantell, GM. The effect of eugenol on oral mucous membrane. *Journal of Dental Research*, 1978; 57: 954-957.
- Lai, FA; Erickson, HF; Rousseau, E; Liu, QY; Meeissner, G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from frog skeletal muscle. *Nature*, 1988; 331: 315-319.
- Lamb, GD; Posterino, GS and Stephenson, DG. Effects of heparin on excitation-contraction coupling in skeletal-muscle of toad and rat. *J Physiol*, 1994; 474:319-329.
- Launikonis,B.S.; Stephenson,D.G. Effect of saponin treatment on the sarcoplasmic reticulum of rat, cane toad and crustacean (yabby) skeletal muscle. *Journal of Physiology-London*, 1997; 504:425-437.
- Lavabre, M. Aromaterapia: A cura pelos óleos essenciais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Record, 1997.
- Lavoie,E.J.; Adams,J.D.; Reinhardt,J.; Rivenson,A.; Hoffmann,D. Toxicity Studies on Clove Cigarette-Smoke and Constituents of Clove - Determination of the  $\text{LD}_{50}$  of Eugenol by Intratracheal Instillation in Rats and Hamsters. *Archives of Toxicology*, 1986; 59:78-81.
- Lea,T.J. Caffeine and micromolar  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations can release  $\text{Ca}^{2+}$  from ryanodine-sensitive stores in crab and lobster striated muscle fibres. *Journal of Experimental Biology*, 1996; 199:2419-2428.



- Leal-Cardoso, JH; Coelho-de-Souza, AN; Souza, IT; Figueiredo, IM. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 1994; 327(1): 113-124.
- Lehrer, SS; Golitsina, NL; Geeves, MA. Actin-tropomyosin activation of myosin subfragment-1 ATPase and thin filament cooperativity. The role of tropomyosin flexibility and end-to-end interactions. *Biochemistry*, 1997; 36: 13449-13454.
- Li K, He H, Li C, Sirois P & Rouleau JL. Myocardial  $\alpha 1$ -adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications. *Life Sc*, 1997; 60:1305–1318.
- Li, L; DeSantiago, J; Chu, G; Kranias, EG; Bers, DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in  $\beta$ -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American Journal of Physiology*, 2000; 278: H769-H779.
- Li, T. Sperelakis, N; TenEick, RE; Solaro, JR. Effects of diacetyl monoxime on cardiac excitation-contraction coupling. *J. Pharm Exp. Ther.*, 1985; 232:688-695.
- Li, T.; Sperelakis, N.; Teineck, R. E.; & Solaro, J. R. Effects of diacetyl monoxime on cardiac excitation-contraction coupling. *J.Pharmacol. Exp. Ther*, 1984; 232, 688-695.
- Lipp, P; Hüser, J; Pott, L. & Niggli, E. Spatially non-uniform  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced by reduction of transverse tubules in citrate-loaded guinea-pig ventricular myocytes in culture. *J. Physiol*, 1996a; 497:589-597.
- Lipp, P; Hüser, J; Pott, L. & Niggli, E. Subcellular properties of triggered  $\text{Ca}^{2+}$  waves in isolated citrate-loaded guinea-pig atrial myocytes characterized by ratiometric confocal microscopy. *J Physiol*, 1996b; 497:599-610.
- Lipp, P; Laine, M; Tovey, SC; Burrell, KM; Berridge, MJ; Li, W and Bootman, MD. Functional  $\text{InsP}_3$  receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Current Biology*, 2000; 10:939-942.

- Lipp, P; Pott, L; Callewaert, G & Carmeliet, E. Simultaneous recording of Indo-1 fluorescence and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange current reveals two components of  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum of cardiac atrial myocytes. *FEBS Lett*, 1990; 275:181-184.
- Lofrano-Alves, MS; Oliveira, EL; Damiani, CEN; Kassouf-Silva, I and Fogaça, RTH; Eugenol-induced contractions of saponin-skinned fibers are inhibited by heparin or by a ryanodine receptor bloker. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2005; 83:1-8.
- Lorell, BH; Apstein, CS; Cunningham, MJ; Schoen, FJ; Weiberg, EO; Peeters, GA; Barry, WH. Contribution of endothelial cells to calcium-dependent fluorescence transients in rabbit hearts loaded with indo-1. *Circ. Res*, 1990; 67:415-425.
- Ma J. Block by ruthenium red of the ryanodine-activated calcium release channel of skeletal muscle. *J Gen Physiol*, 1993; 102:1031–1056.
- Mack MM; Zimányi I; Pessah IN. Discrimination of multiple binding sites for antagonists of the calcium release channel complex of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992; 262:1028–1037.
- Mackenzie L; Bootman MD; Laine M; Berridge MJ; Thuring J; Holmes A; Li WH; Lipp P. The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J Physiol*, 2002; 541: 395–409.
- Mackenzie, L.; Roderick, H.L.; Berridge, M.J.; Conway, S.J. & Bootman, M.D. The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signaling modulates contraction. *J Cell Sci*, 2004; 117:6327-6337.
- MacMillan, D; Chalmers, S; Muir, TC; McCarron, JG.  $\text{IP}_3$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  increases do not involve the ryanodine receptor, but ryanodine receptor antagonists reduce  $\text{IP}_3$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  increases in guinea-pig colonic smooth muscle cells. *J. Physiol*; 2005; 569.2:533-544.

- Maranto AR. Primary structure, ligand binding, localization of the human type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expressed in intestinal epithelium. *J Biol Chem*, 1994; 269: 1222–1230.
- Marchant, J.S. & Parker, I. Functional interactions in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling over different time and distance scales. *J Gen Physiol*, 2000; 116:691-696.
- Maruyama, T; Kamaji, T; Nakada, S; Kanno, T; Mikoshiba, K; 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J Biochem*, 1997; 5005:498-505.
- Marx, SO; Gaburjakova, J; Gaburjakova, M; Henrikson, C; Ondrias, K; Marks, AR. Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res*, 2001; 88:1151–1158.
- Matsubara,I.; Maughan,D.W.; Saeki,Y.; Yagi,N. Cross-Bridge Movement in Rat Cardiac-Muscle As A Function of Calcium-Concentration. *Journal of Physiology-London*, 1989; 417:555-565.
- Maylie, J; Hui, CS; Action of 2,3-butanedione monoxime on calcium signals in frog cut twitch fibers containing Anipyrylazo-III. *J Physiol*, 1991; 442:551-567.
- Meissner, G. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochemistry, Biophysics Acta*, 1975; 389: 51-68.
- Meissner, G. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochemistry, Biophysics Acta*, 1975; 389: 51-68.
- Meissner, G. Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 1986; 261 (14): 6300-6306.

- Michikawa, T; Hamanaka, H; Otsu, H; Yamamoto, A; Miyawaki, A; Furuichi, T; Tashiro, Y; Mikoshiba, K; Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *J. Biol. Chem*, 1994; 269:9184-9189.
- Mignery, GA; Südhof, TC; Takei, K and Camilli, P. Putative receptor for inositol 1, 4, 5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature*, 1989; 342:192-195.
- Mignery, GA; Südhof, TC; The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5,-triphosphate receptor. *EMBO J.*, 1990; 9:3893-3898.
- Minamikawa, T., Cody, S., & Williams, D. In situ visualization of spontaneous calcium waves within perfused whole rat heart by confocal imaging. *Am J Physiol*, 1997; 272:H236–H243.
- Missiaen, L.; Callewaert, G.; De Smedt, H.; and Parys, J. B. 2-aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pump and the non-specific leak from the non-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  stores in permeabilised A7r5 cells. *Cell Calcium*, 2001; 29:111–116
- Missiaen, L; Callewaert, G; De Smedt, H; Parys, JB;. 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol, 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pump and the non-specific leak from the non-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  stores in permeabilised A7r5 cells, *Cell Calcium*, 2001; 29:111–116.
- Moore, ED; Voigt, T; Kobayashi, YM; Isenberg, G; Fay, FS; Gallitelli, MF; Franzini-Armstrong, C. Organization of  $\text{Ca}^{2+}$  release units in excitable smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *Biophysical Journal*, 2004; 87:1836-1847.
- Moraru II; Kaftan EJ; Ehrlich BE; Watras J; Regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channels by  $\text{InsP}_3$  and calcium: simulation of single channel kinetics based on ligand binding and electrophysiological analysis. *J Gen Physiol*, 1999; 113: 837–849.

- Morris SA; Nerou EP; Riley AM; Potter BV; Taylor CW; Determinants of adenophostin A binding to inositol trisphosphate receptors. *Biochem*, 2002; J 367: 113–120.
- Moschella,M.C.; Marks,A.R.. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Expression in Cardiac Myocytes. *Journal of Cell Biology*, 1993; 120:1137-1146
- Mulieri, LA; Alpert, NR. Differential effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on activation and contraction. *Biophys.*, 1984; 45-47.
- Nishijima, H; Uchida, R; K; Kawakami, N; Shimamura, K; Kitamura, K. Role of endothelium and adventitia on eugenol-induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. *Journal of Smooth Muscle Research*, 1998; 34: 123-137.
- Nomura, N; Satoh, H; Terada, H; Hayashi, H. CAM II is responsible for reactivation of SR Ca uptake and contractile recovery during intracellular acidosis. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 2000; 32: A98.
- Nosek, TM; Willians, MF; Ziegler, ST and Godt, RE. Inositol trisphosphates enhances calcium release in skinned cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1986; 250:C807-C811.
- O'Neill, SC; Miller, L; Hinch, R; Eisner, DA. Interplay between SERCA and sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  efflux pathways controls spontaneous release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 2004; 559.1:121-12
- Obermann, WM; Plessmann, U; Weber, K; Furst, DO. Purification and biochemical characterization of myomesin, a myosin-binding and titin-binding protein from bovine skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry*, 1995; 233: 110-115.
- Offer, G. C-protein and periodicity in the thick filaments of vertebrate skeletal muscle. *Cold Spring Harbor Symposium Quant Biol*, 1972; 37: 87-93.

- Ogawa, Y. Role of ryanodine receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1994; 29:229-274.
- Ohkubo, T & Kitamura, K. Eugenol activates  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *Journal of Dental Research*, 1997; 76(11): 1737-1744.
- Ohtsuki, I. Molecular arrangement of troponin T in the thin filament. *Journal of Biochemistry*, 1979; 86: 491-497.
- Opie, LH. Regulation of myocardial contractility. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1995; 26: S1-S9.
- Ostwald, TJ & MacLennan, DH. Isolation of high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 1974; 249: 974-979.
- Ozeki, M. The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1975; 50C: 183-191.
- Page, E. Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology. *American Journal of Physiology*, 1978; 235: C147-C158.
- Page, E; McCallister, LP; Power, B. Stereological measurements of cardiac ultrastructures implicated in excitation-contraction-coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1971; 68: 1465-1466.
- Peppiatt, MC; Collins, TJ; Mackenzie, L; Conway, SJ; Holmes, AB; Bootman, MD; Berridge, MJ; Seo, JT; Roderick, HL;. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium*, 2003; 97-108.

- Perez DM, DeYoung MB & Graham RM. Coupling of expressed  $\alpha 1B$ - and  $\alpha 1D$ -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol*, 1993; 44:784–795.
- Perez, PJ; Ramos-Franco, J; Fill, M and Mignery, G. Identification and functional reconstitution of the type 2 Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997; 19:23961-23969.
- Perez-Reyes, E & Schneider, T. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int*, 1995; 48: 1111-1124.
- Piacentino, V. III, DiPaola, K., Gaughan, J. P. & Houser, S. R. Voltage-dependent  $Ca^{2+}$  release from the SR of feline ventricular myocytes is explained by  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release. *J. Physiol*, 2000; 523, 533–548
- Poggioli, J., Sulpice, J. C. & Vassort, G. Inositol phosphate production following  $\alpha 1$ -adrenergic, muscarinic, or electrical stimulation in isolated rat heart. *FEBS Lett*, 1986; 206, 292–298.
- Pogwizd, SM.; Schlotthauer, K; Li, L; Yuan, W & Bers, DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium–calcium exchange, inward rectifier potassium current and residual  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Circ. Res*, 2001; 88, 1159–1167.
- Potocnik, SJ; Hill, MA; Pharmacological evidence for capacitative  $Ca^{2+}$  entry in cannulated and pressurized skeletal muscle arterioles, *Br. J. Pharmacol*, 2001; 134:247–256.
- Ramos-Franco, J; Fill, M; Mignery, GA; Isoform-specific function of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channels. *Biophys J.*, 1998; 75:834-839.
- Ramos-Franco, J; Galvan, D; Mignery, GA; Fill, M; Location of the permeation pathway in the recombinant type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Gen Physiol*, 1999; 114:234-250.

- Rayment, I; Holden, HM; Whittaker, M; Yohn, CB; Lorenz, M; Holmes, KC; Milligan, RA. Structure of actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 1993a ; 261: 58-65.
- Rayment, I; Holden, HM; Whittaker, M; Yohn, CB; Lorenz, M; Holmes, KC; Milligan, RA. Structure of actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 1993b; 261: 58-65.
- Ringer, S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *Journal of Physiology*, 1883; 4: 29-47.
- Rüegg, JC. Towards a molecular understanding of contractility. *Cardioscience*, 1990; 1: 163-167.
- Sasaki, T; Inui, M; Kimura, Y; Kuzuya, T; Tada, M. Molecular mechanism of regulation of Ca<sup>2+</sup> pump ATPase by phospholamban in cardiac sarcoplasmic reticulum. Effects of synthetic phospholamban peptides on Ca<sup>2+</sup>-pump ATPase. *J Biol Chem*, 1992; 267:1674–1679.
- Scales, DJ. Aspects of the mammalian cardiac sarcotubular system revealed by freeze-fracture electron microscopy. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 1981; 13: 373-380.
- Scholz, J; Schaeffer, B; Schmitz, W; Scholz, H; Steinfath, M; Lohse, M; Schwabe, U and Puurunen, J.  $\alpha_1$ -adrenoreceptor-mediated positive inotropic effect and inositol trisphosphate increase in mammalian heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988; 245:337-345.
- Schouten, V.J.A.; Morad, M. Regulation of Ca<sup>2+</sup> Current in Frog Ventricular Myocytes by the Holding Potential, Camp and Frequency. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 1989; 415:1-11.



- Schumann HJ, Wagner J, Knorr A, Reidemeister JC, Sadony V & Schramm G. Demonstration in human atrial preparations of  $\alpha$ -adrenoceptors mediating positive inotropic effects. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1978; 302:333–336.
- Sham, JSK; Hatem, SN; Morad, M. Species differences in the activity of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in mammalian cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, 1995; 488: 623-631.
- Sheehan, K.A.; Blatter, L.A. Regulation of junctional and non-junctional sarcoplasmic reticulum calcium release in excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *Journal of Physiology-London*, 2003; 546:119-135.
- Singer, D; Biel, M; Lotan, I; Flockerzi, V; Hofmann, F; Dascal, N; The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*, 1991; 253:1553-1557.
- Singer, S.J.; Nicolson, G.L. Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes. *Science*, 1972: 175:720.
- Skomedal T, Aass H, Osnes JB, Fjeld NB, Klingen G, Langslet A & Semb G. Demonstration of  $\alpha$  adrenoceptor-mediated inotropic effect of norepinephrine in human atria. *J Pharmacol Exp Therapeutics*, 1985; 233:441–446.
- Smith, JS; Rousseau, E and Meissner, G. Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ Res*, 1989; 64:352-359.
- Solaro, RJ & Rarick, HM. Troponin and tropomyosin—proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ. Res*, 1998; 83, 471–480.
- Solovyova, N. Pernyough, P; Glazner, G; Verkhatsky, A. Xestospongins empty the ER calcium stores but do not inhibit  $\text{InsP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in cultured dorsal root ganglia neurons. *Cell Calcium*, 2002; 32:49-52.

- Sperelakis, N; Katsube, Y; Yokoshiki, H; Sada, H; Sumii, K. Regulation of the slow  $\text{Ca}^{2+}$  channels of myocardial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1996; 163-164: 85-98.
- Steinberg SF, Drugge ED, Bilezikian JP & Robinson RB. Acquisition by innervated cardiac myocytes of a pertussis toxin-specific regulatory protein linked to the alpha 1-receptor. *Science*, 1985; 230:186–188.
- Stephenson, D. G & West, J. M. Contractile activation and the effects of 2,3-butanedione (BDM) in skinned preparations from normal and dystrophic mice. *Pflug. Arch-Eur. J. Physiol.* 413, 546-552, 1989.
- Stephenson, DG; Wendt, IR. Effects of procaine on calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum of mechanically disrupted rat cardiac muscle. *J. Physiol*, 1986; 373:195-207.
- Stewart, PS; & MacLennan, DH. Surface particles of sarcoplasmic reticulum membranes. Structural features of the adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*; 1974, 249: 985-993.
- Sticht, FD & Smith, RM. Eugenol: some pharmacologic observations. *Journal of Dental Research*, 1971; 50: 1531-1535.
- Südhof, T; Newton, C; Archer, B; Ushkaryov, Y and Mignery, G. Structure of a novel  $\text{InsP}_3$  receptor. *EMBO (Eur Mol Biol Orgn)*, 1991; 11:3199-3206.
- Supattapone, S; Worley, PF; Baraban, JM and Snyder, SH. Solubilization, purification and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 1988; 263:1530-1534.
- Taylor CW; da Fonseca PC; Morris EP.  $\text{IP}_3$  receptors: the search for structure. *Trends Biochem Sci*, 2004; 29: 210–219.

- Terzic A, Puceat M, Clement O, Scamps F & Vassort G. Alpha 1-adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. *J Physiol*, 1992; 447:275–292.
- Thompson, D & Eling, T. Mechanism of inhibition of prostaglandin H synthase by eugenol and other phenolic peroxidase substrates. *Molecular Pharmacology*, 1989; 36: 809-817.
- Thompson, D; Norbeck, K; Olsson, L-I; Constantin-Teodosiu, D; van der Zee, J; Moldéus, P. Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol: Formation of a cytotoxic metabolite(s). *The Journal of Biological Chemistry*, 1989; 264(2): 1016-1021.
- Tripathy,A.; Xu,L.; Pasek,D.A.; Meissner,G. Effects of 2,3-butanedione 2-monoxime on  $\text{Ca}^{2+}$  release channels (ryanodine receptors) of cardiac and skeletal muscle. *Journal of Membrane Biology*, 1999; 169:189-198.
- Tsien, RW & Tsien, RY. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annual Reviews in Cell Biology*, 1990; 6:7715-760.
- Vaughan-Jones, RD. Excitation and contraction in heart: the role of calcium. *Brith Medical Bulletin*, 1986; 42: 413-420.
- Vergara, J. and C. Caputo. Effects of tetracaine on charge movements and calcium signals in frog skeletal muscle fibers. *Proceedings of the National Aeademy of Sciences, USA*, 1983; 80:14~77-1,481.
- Vites A-M, Pappano AJ; Distinct modes of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994; 268:1476–1484
- Wang,Y.G.; Dedkova,E.N.; Ji,X.; Blatter,L.A.; Lipsius,S.L. Phenylephrine acts via IP3-dependent intracellular NO release to stimulate L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in cat atrial myocytes. *Journal of Physiology-London*, 2005; 567:143-157.

- Warshaw, DM. The in vitro motility assay: A window into the myosin molecular motor. *News in Physiological Sciences*, 1996; 11: 1-7.
- Wei, XY; Pan, S; Lang, WH; Kim HY; Schneider, T; Perez-Reyes, E; Birnbaumer, L; Molecular determinants of cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channel pharmacology – Subunit requirement for the high affinity and allosteric regulation of dihydropyridine binding. *J Biol Chem*, 1995; 270: 27106-27111.
- Wibo, M; Bravo, G; Godfraind, T. Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. *Circulation Research*, 1991; 68: 662-673.
- Wier, W. G. & Balke, C. W.  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanisms,  $\text{Ca}^{2+}$  sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ. Res.* 1999; 85, 770–776.
- Williams AJ; West DJ; Sitsapesan R; Light at the end of the  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Q Rev Biophys*, 2001; 34: 61–104.
- Williams, JH; Ward, CW; Reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum at low pH. *Can J Physiol Pharmacol*, 1992; 70:926-930.
- Winegrad, S. Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. *Journal of General Physiology*, 1965; 48: 455-479.
- Woodcock, EA; Matkovich, SJ.  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  receptor and inositol phosphates in the heart – evolutionary artefacts or active signal transducers. *Pharmacology & Therapeutics*, 2005; 107:240-251.
- Wright, SE; Baron, DA; Heffner, JE. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: Proposed oxidant mechanisms. *Journal of Laboratorial and Clinical Medicine*, 1995; 125: 257-264.

- Wu,X.; Zhang,T.; Bossuyt,J.; Li,X.D.; McKinsey,T.A.; Dedman,J.R.; Olson,E.N.; Chen,J.; Brown,J.H.; Bers,D.M. Local InsP(3)-dependent perinuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *Journal of Clinical Investigation*, 2006; 116:675-682.
- Xu, L; Lai, FA; Cohn, A; Etter, E; Guerrero, A; Fay, FS; Meissner, G. Evidence for a  $\text{Ca}(21)$ -gated ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release channel in visceral smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994; 91:3294–3298.
- Yamada, M; Miyawaki, A; Saito, K; Nakajima, T; Yamamoto-Hino, M; Ryo, Y; Furuichi, T; Mikoshiba, K; The calmodulin-binding domain in the mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J*, 1995; 308:83-88.
- Yang,J.; McBride,S.; Mak,D.O.D.; Vardi,N.; Palczewski,K.; Haeseleer,F.; Foskett,J.K. Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002; 99:7711-7716.
- Yokoyama, C.T., et al. Mechanism of SNARE protein binding and regulation of  $\text{Cav}^{2+}$  channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site. *Mol. Cell. Neurosci.* 2005; 28:1–17.
- Yoshikawa F; Morita M; Monkawa T; Michikawa T; Furuichi T; Mikoshiba K; Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 1996; 271: 18277–18284.
- Yue, DT; Marban, E; Wier, WG. Relationship between force and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in tetanized mammalian muscle. *Journal of General Physiology*, 1986; 87: 223-242.
- Zahradníková A, Palade P. Procaine effects on single sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *Biophys J*, 1993; 64:991–1003.

Zima, AV; Blatter, LA; Inositol-1,4,5-triphosphate-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. J Physiol, 2004; 555:607-615.

Zot, AS & Potter, JD. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. Annual Review Biophysics and Chemistry, 1987; 16: 535-559.